

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Etude de l'effet de l'hypoxie intermittente sur les cellules endothéliales

Roegiers, Audrey

Award date:
2007

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

Etude de l'effet de l'hypoxie intermittente sur les cellules endothéliales

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques

Audrey ROEGIERS

Juin 2007

Liste des abréviations utilisées

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
Akt	Protéine Kinase B
AMH	anti-Müllerian hormone
AP-1	Activated Protein 1
ARE	Antioxidant responsive element
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNT	Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
ATP	Adénosine triphosphate
BAFF	B cell-activating factor
BAG3	BCL2-associated athanogene 3
BSA	Bovine Serum Albumin
bFGF	basic Fibroblast Growth factor
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
CBP	Creb binding protein
CCl2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta
CSF	Colony stimulating factor
Ct	Cycle threshold
Cul2	Cullin 2
CXCL1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1
DCF	Dichloroflorescéine
dNTP	Déoxynucléotides triphosphate
DO	Densité Optique
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Ethylène Diamine Tétra Acétique
EGR1	Early growth response 1
ELAM-1	Endothelial adhesion molecule 1
EPHB2	EPH receptor B2
EPO	Erythropoïétine
EPOR	Erythropoietin receptor
ERK	Elk-related tyrosine kinase
FADD	Fas associated death domain
F2R	Coagulation factor II (thrombin) receptor
FGF2	Fibroblast growth factor 2
FLT4	Fms-related tyrosine kinase 4
FosL1	FOS-like antigen 1
GCS	Glutamate Cystéine Ligase
Glut-1	Transporteur de glucose 1
Grb2	Growth factor receptor bound protein 2
GSH	Glutathion
GST	Glutathione S–transférase
HB	Hypotonic Buffer
HBEGF	Heparin-binding EGF-like growth factor
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog

HC	Hypoxie chronique
HI	Hypoxie intermittente
HIF-1	Hypoxia Inducible Factor-1
HRE	Hypoxia Response Element
HO-1	Hème Oxygénase 1
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFNAR1	Interferon-alpha receptor 1
IGF2	Insulin-like growth factor 2
IKK	I kappa B Kinase
IL1	Interleukine 1
IRF	Interferon regulatory factor
ISGF3G	Interferon-stimulated transcription factor 3 gamma
kD	Kilo Dalton
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
KDR	Kinase insert domain receptor
LPS	Lipopolysaccharide
mA	Milli Ampère
MAP2K7	Mitogen-activated protein kinase kinase 7
MEC	Matrice Extra Cellulaire
MEK	MAP kinase kinase
N	Normoxie
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NF-κB	Nuclear Factor kappa B
NQO1	NADPH quinone oxidoreductase
Nrf2	Nuclear related factor 2
NRG1	Neuregulin 1
OH	Hydroxyl
Oligo	Oligonucléotide
PAS	Per-ARNT-Sim
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PGF	Placental growth factor
PFA	Paraformaldéhyde
PKC	Protéine kinase C
PKD	Protéine kinase D
PLAA	Phospholipase A2-activating protein
PLCγ	Phospholipase Cγ
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PPIE	Peptidylprolyl isomerase E (cyclophilin E)
PVDF	PolyVinylidène DiFluoride
pVHL	Protéine von Hippel-Lindau
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIB	Phosphatase Inhibitor Buffer
PIC	Phosphatase Inhibitor Cocktail
Rbx1	Ring-box 1
RE	Tampon de resuspension
RFU	Relative fluorescence units
RHD	Rel Homology Domain

RLU	Relative Light Units
ROS	Reactive Oxygen Species
Rpm	Rotations par minute
RT	Room Temperature
RT PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RUNX1	Runt related transcription factor 1
SA	Tampon salin
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
Syk	Spleen tyrosine kinase
TAP1	Transporter 1, ATP-binding cassette
TBHQ	Terbutyl Hydroquinone
TCR	T cell receptor
TFRC	Transferrin receptor
TGF α	Transforming growth factor alpha
THBD	Thrombomodulin
TIMP	Tissue inhibitor of metalloprotéase
TMB	Tétra méthyl benzidine
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAF2	TNF-receptor-associated factor 2
Tris	Tris Hydroxy Méthyl Aminométhane
TSAd	T cell-specific adapter protein
UV	Ultraviolet
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

Etude de l'effet de l'hypoxie intermittente sur les cellules endothéliales

Roegiers Audrey

Résumé

Le microenvironnement des tumeurs solides est hypoxique et les cellules au sein de la tumeur sont exposées à deux types d'hypoxie : l'hypoxie chronique et l'hypoxie intermittente.

L'hypoxie chronique est causée par une augmentation de distance de diffusion entre les vaisseaux sanguins et les cellules tumorales. L'hypoxie intermittente est quant à elle liée à une structure et une fonction anormales des vaisseaux qui alimentent la tumeur. Les cellules tumorales répondent à cette hypoxie en produisant des facteurs angiogéniques qui vont permettre la croissance des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et ainsi participer à la création d'un nouveau réseau vasculaire permettant d'apporter oxygène et nutriment aux cellules tumorales.

Il a été démontré récemment que l'hypoxie et plus particulièrement l'hypoxie intermittente protégeait les cellules tumorales et endothéliales contre certains stress proapoptotiques tels que la radiothérapie. Cette hypoxie tumorale va en effet permettre à la tumeur de moduler sa réponse aux traitements (radiothérapie, agents chimiques), d'exercer une pression sélective et de moduler l'angiogénèse. Au cours de ce mémoire, nous avons essayé de comprendre les mécanismes au cœur de cette résistance et l'effet de l'hypoxie intermittente sur le phénotype angiogénique des cellules endothéliales.

Pour ce faire, deux approches ont été envisagées. La première a consisté en l'étude de l'influence de l'hypoxie intermittente et de l'hypoxie chronique sur l'activité de trois facteurs de transcription : HIF1, Nrf2 et NF- κ B. La deuxième approche a été consacrée à l'étude, dans ces mêmes conditions, de l'expression d'une série de gènes impliqués dans l'inflammation et l'angiogénèse.

Les résultats obtenus montrent tout d'abord que l'hypoxie intermittente entraîne une résistance des cellules endothéliales à la mort cellulaire. Le facteur de transcription impliqué dans la survie cellulaire en hypoxie, HIF est activé dans ces conditions. Par contre, Nrf2 et NF- κ B ne sont pas activés dans ces conditions. Les résultats obtenus dans la deuxième partie du travail montrent que l'hypoxie intermittente induit des changements d'expression génique qui sont différents de ceux observés en hypoxie chronique. Ces changements pourraient favoriser d'une part la survie cellulaire et d'autre part un phénotype angiogénique.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2007

Promoteur: C. Michiels

Avant-propos

Actuellement, il est difficile d'imaginer quelqu'un qui n'a jamais entendu parler de la maladie nommée « cancer ». Dix millions de nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année à travers le monde.

Le cancer est une maladie qui se traduit par une prolifération anormale de cellules entraînant la formation d'une tumeur.

Notre organisme contient un grand nombre de cellules qui chacune, joue un rôle précis. Elles s'organisent et se regroupent pour former des tissus ou des organes, et se renouvellent en permanence. C'est le génome de chaque cellule qui contrôle son fonctionnement.

Sous l'influence de facteurs de l'environnement, (tabac, le soleil...), de certains agents chimiques ou physiques, ou encore de certains virus, le génome humain subit des altérations, qu'il est en mesure de réparer. Lorsque ce système de réparation est défectueux ou débordé, la cellule conserve ces mutations et devient anormale.

La cellule va alors adopter de nouvelles caractéristiques et proliférer de manière anarchique. En se multipliant de façon anarchique, les cellules cancéreuses donnent naissance à des tumeurs de plus en plus grosses. Ces tumeurs peuvent malheureusement, lorsqu'elles s'étendent, provoquer la mort de l'individu atteint. Chaque année, le cancer cause la mort de plusieurs milliers de personnes.

Une nouvelle rassurante, est que d'énormes progrès ont été faits au cours des dernières décennies dans la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires à la base du développement du cancer.

Une révolution récente dans le traitement du cancer consiste à cibler le réseau vasculaire qui irrigue une tumeur. Il est en effet bien établi que le développement d'une vascularisation intra tumorale joue un rôle primordial dans la croissance et la dissémination de la tumeur.

Les connaissances grandissantes sur les mécanismes impliqués dans l'angiogenèse ont permis d'identifier une série de molécules qui participent au contrôle de la formation, de la maturation et du remodelage du système vasculaire et ainsi de mettre en place des traitements qui ciblent ces processus. Sans s'attaquer directement à la tumeur, ces nouveaux médicaments ouvrent un nouveau moyen de combattre le cancer, en privant les tumeurs des vaisseaux sanguins qui la nourrissent.

Actuellement, de nombreuses études ont également montré que l'hypoxie présente au sein des tumeurs, engendre une résistance des cellules tumorales mais aussi endothéliales aux thérapies anticancéreuses.

Au cours de ce mémoire, nous allons donc tenter de mieux comprendre comment l'hypoxie affecte le comportement des cellules endothéliales, ce qui permettra peut-être par la suite d'améliorer les thérapies anti-angiogéniques.

Cette introduction traitera des mécanismes sous-jacents à l'angiogenèse, de l'hypoxie ainsi que des facteurs de transcription HIF-1, Nrf2 et NF- κ B, impliqués dans la réponse transcriptionnelle aux conditions d'hypoxie.

Introduction

1. L'angiogenèse

Principe

Le système cardiovasculaire est le premier système à se développer et à atteindre un état fonctionnel au sein de l'embryon. Les étapes initiales consistent en la vasculogenèse qui est la formation de vaisseaux sanguins à partir de précurseurs : les hémangioblastes et les angioblastes. Durant la vasculogenèse, les angioblastes prolifèrent et s'assemblent en formant un réseau primitif de vaisseaux connu sous le nom de plexus capillaire primitif.

Le treillage de cellules endothéliales créé par la vasculogenèse servira alors d'échaffaudage pour l'angiogenèse. (Papetti and Herman 2002)

L'angiogenèse est en effet un procédé de vascularisation d'un tissu impliquant le développement de nouveaux vaisseaux capillaires à partir de vaisseaux préexistants. Ce processus est indispensable pendant toute la croissance pour permettre le développement normal des tissus, puisque les vaisseaux sanguins permettent le transport du sang qui apporte les nutriments, l'oxygène et élimine les déchets du métabolisme des cellules.

L'angiogenèse est régulée par de nombreux facteurs de croissance et de cytokines proinflammatoires, et est tempérée par un groupe divers d'inhibiteurs de l'angiogenèse. Elle a lieu au cours de nombreux processus physiologiques tels que le développement embryonnaire, l'implantation du placenta, l'ovulation mais aussi pathologiques, comme au cours de la croissance des tumeurs. L'angiogenèse tumorale permet à la tumeur de maintenir sa croissance et facilite la propagation métastatique en établissant des connexions avec la vasculature déjà existante. (Polverini 1995)

Il existe deux différences importantes entre l'angiogenèse normale et l'angiogenèse pathologique.

Tout d'abord, dans les tissus malades, les mécanismes régulateurs qui arrêtent la néovascularisation dans les tissus sains ne fonctionnent pas normalement. Il y a alors un déséquilibre de la balance des régulateurs positifs et négatifs de l'angiogenèse en faveur des molécules proangiogènes.

Deuxièmement, les vaisseaux formés dans les tissus malades sont complètement désorganisés et leur paroi présente de nombreuses ouvertures. Cela est notamment dû au fait que les vaisseaux tumoraux sont incapables de se maturer via le recrutement de péricytes et de cellules musculaires lisses, menant alors à la formation de vaisseaux fenestrés dans les tumeurs.

Il existe deux groupes de médiateurs angiogéniques : les stimulateurs et les inhibiteurs de l'angiogenèse.

La majorité des molécules stimulatrices sont des protéines, et de nombreuses d'entre elles sont des facteurs de croissance qui favorisent la division, la migration et la différenciation des cellules endothéliales en structures tubulaires. Elles sont sécrétées par une variété des cellules, incluant les cellules endothéliales elles-mêmes, en réponse aux stimuli de l'environnement.

Ces médiateurs peuvent stimuler l'angiogenèse directement en interagissant avec des récepteurs à la surface des cellules endothéliales, ou indirectement en attirant et en activant des cellules accessoires telles que les macrophages,...

Les inhibiteurs de l'angiogenèse semblent quant à eux influencer la capacité des cellules à interagir avec la matrice extracellulaire ou de la dégrader. Des altérations de l'organisation et

de la composition de la matrice extracellulaire ont été démontrées comme ayant un effet important sur la croissance et la fonction de cellules endothéliales.

Le VEGF

Un facteur de croissance particulier appelé le VEGF (vascular endothelial growth factor) a été identifié comme étant un facteur clé impliqué dans la formation de nouveaux vaisseaux. Le VEGF régule plusieurs fonctions des cellules endothéliales, incluant la prolifération, la différenciation, la perméabilité ainsi que la production de molécules vasoactives. La famille des VEGFs se compose du VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et

PlGF. (Hoebe, Landuyt et al. 2004) Il existe également 4 isoformes différentes de VEGF-A, qui sont générées suite au splicing alternatif d'un seul gène. (Cross, Dixelius et al. 2003)

Ces molécules de VEGF exercent leurs effets en se liant à des récepteurs spécifiques.

Actuellement, trois récepteurs au VEGF ont été identifiés. Il s'agit de récepteurs à activité tyrosine kinase qui une fois activés subissent une autophosphorylation et stimulent des voies de transmission du signal.

Ils sont tous les trois relativement spécifiques des cellules endothéliales et montrent une structure semblable au récepteur de la famille PDGF. Ces trois récepteurs sont VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3 (Figure 1). Ces derniers sont également désignés respectivement par Flt (fms-like tyrosine kinase), KDR (kinase insert domain containing receptor) et FLT4.

Toutes les isoformes du VEGF-A se lient à la fois au VEGFR-1 et au VEGFR-2, alors que PlGF et VEGF-B sont des ligands spécifiques de VEGFR-1. VEGF-C et VEGF-D interagissent à la fois avec le VEGFR-2 et VEGFR-3 alors que VEGF-E est un ligand spécifique au VEGFR-2. (Olsson, Dimberg et al. 2006)

Le VEGFR-2 est le récepteur principal et est notamment responsable de la prolifération, de la migration, de la survie des cellules endothéliales et par conséquent de l'initiation de l'angiogenèse.

Le VEGFR-3 est exprimé principalement dans l'endothélium lymphatique et est impliqué dans la lymphogenèse.

Suite à la liaison du ligand, les récepteurs au VEGF sont capables de former soit des homodimères ou des hétérodimères. La dimérisation du récepteur est accompagnée par l'activation des domaines tyrosine kinase qui mènent à l'autophosphorylation du récepteur. Le récepteur phosphorylé peut alors recruter des protéines et induire l'activation de voies de signalisation (Figure 2).

Le récepteur VEGFR-2 est capable de recruter un certain nombre d'adaptateurs.

La phosphorylation de la tyrosine 1175 permet la liaison, la phosphorylation et l'activation de la phospholipase C γ (PLC γ), menant à un influx de Ca²⁺ et à l'activation de la protéine kinase C (PKC). L'activation de la PKC entraîne la prolifération cellulaire, via la voie de signalisation ERK.

À la tyrosine 1175 phosphorylée peuvent également venir se lier deux molécules, Shb et Sck. Shb entraîne alors l'activation de la PI3 kinase.

Grb2 est quant à lui aussi un stimulateur de la cascade Raf-MEK-ERK.

Une autre tyrosine phosphorylée (Y951) permet la liaison d'une protéine TSAd. TSAd fut tout d'abord identifiée au sein des lymphocytes T mais il est également fortement exprimé dans les cellules endothéliales. TSAd est impliqué dans la réorganisation des microfilaments d'actine et ainsi dans la migration des cellules endothéliales.

Enfin, le VEGFR-2 active la PI3-kinase, résultant en l'activation de molécules intracellulaires importantes telles que Akt et la petite protéine Rac. La voie Akt participe à la régulation de la survie cellulaire ainsi que de la perméabilité vasculaire.(Matsumoto and Mugishima 2006) L'ensemble de ces voies induit l'activation des cellules endothéliales vers un phénotype angiogénique.

Angiogenèse tumorale

La croissance rapide de la masse tumorale va rapidement distancer les cellules de leur système vasculaire et entraîner petit à petit un manque en oxygène et en nutriments. En effet, lorsque la distance entre les cellules tumorales et le capillaire devient supérieure à la limite de diffusion de l'oxygène, l'oxygène n'est plus capable de parvenir aux cellules et il y a ainsi formation d'une zone hypoxique au sein de la tumeur.

Cette diminution de la concentration en oxygène mène à l'activation d'un facteur de transcription nommé HIF (hypoxia inducible factor), qui augmente la transcription de gènes cibles tels que le VEGF-A. Ce facteur de transcription sera abordé par la suite.

Le produit de ce gène, en agissant en concertation avec un certain nombre d'autres protéines, stimule la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, qui migrent en direction de la tumeur et rétablissent dès lors l'homéostasie en oxygène et en nutriments.

En effet, la liaison du VEGF à son récepteur entraîne l'activation des cellules endothéliales des capillaires adjacents. Activées, ces cellules acquièrent de nouvelles propriétés de prolifération et d'invasion tissulaire. Il va aussi y avoir production d'enzymes qui vont entraîner la dégradation de la MEC.

Libérées de la MEC, les cellules endothéliales prolifèrent et migrent en direction de la tumeur. Les cellules endothéliales se réorganisent finalement en structures tubulaires, formant de nouveaux vaisseaux immatures mais fonctionnels. Les cellules endothéliales vont ensuite induire la mise en place de la paroi vasculaire (composée des péricytes et de la MEC) qui assure la stabilisation des nouveaux vaisseaux.(Gupta and Qin 2003)

La tumeur a ainsi mis en place sa propre vascularisation qui pourra alors soutenir sa croissance (Figure 3)(Kalluri 2003).

L'inhibition de l'angiogenèse, en particulier en bloquant le VEGF, est actuellement fortement investiguée comme moyen d'inhiber ce mécanisme qui permet la survie des cellules tumorales, comme nouvelle stratégie de lutte anticancéreuse.

Structure des vaisseaux tumoraux

La structure des vaisseaux tumoraux n'est cependant pas la même que celle du réseau vasculaire normal (Figure 4). Le système vasculaire normal est un réseau organisé et stable. Sa localisation est appropriée. Le flux sanguin du réseau vasculaire normal est régulé et la perméabilité des capillaires est contrôlée. Par contre, le réseau vasculaire tumoral est complètement désorganisé et instable. Les capillaires présentent une perméabilité accrue pouvant entraîner des hémorragies. Des shunts artério-veineux s'établissent contribuant à l'établissement d'un flux sanguin irrégulier, non contrôlé par les agents vaso-actifs. Enfin, la couverture des capillaires par les péricytes est insuffisante.

Les vaisseaux tumoraux présentent également des anomalies fonctionnelles : hétérogénéité des flux sanguin et lymphatique, élévation de la pression interstitielle dans la tumeur du fait de l'accroissement de la perméabilité vasculaire, baisse de la pression partielle d'oxygène et acidose dans la tumeur. Le micro-environnement tumoral est donc profondément perturbé et

peut présenter des zones d'hypoxie. L'hypoxie favorise comme nous l'avons vu précédemment la production de facteurs angiogéniques par les cellules tumorales, le développement de néo-vaisseaux et ainsi la croissance de la tumeur. S'établit alors un cercle vicieux favorisant la progression tumorale. (Brown and Giaccia 1998; Papetti and Herman 2002)

2. Hypoxie

Principe

Un apport adéquat en oxygène est essentiel à la vie de tous les organismes supérieurs parce que l'oxygène sert d'accepteur final des électrons dans la phosphorylation oxydative mitochondriale. De plus, de nombreux processus enzymatiques requièrent de l'oxygène moléculaire comme substrat.

La capacité de sentir et de répondre aux changements d'oxygène est donc essentielle pour la survie des organismes. Les mammifères ont développé des mécanismes senseurs d'oxygène pour maintenir l'homéostasie cellulaire et tissulaire et s'adapter aux conditions de faibles concentrations en oxygène si nécessaire.

L'hypoxie est définie comme étant une diminution de la concentration en oxygène résultant d'un apport en oxygène inadéquat. L'hypoxie peut être causée par de nombreux facteurs tels qu'une faible pression partielle en O₂ dans le sang artériel dû notamment à de hautes altitudes ou à des maladies pulmonaires, une perfusion réduite des tissus,...

L'hypoxie est une condition rencontrée au cours de l'embryogenèse dans laquelle un signal hypoxique est considéré comme nécessaire à un développement normal. Un dysfonctionnement de l'homéostasie en oxygène est également un événement central dans un grand nombre de situations pathophysiologiques telles que lors de maladies vasculaires, d'inflammation chronique et de cancers.

L'hypoxie tumorale résulte d'un déséquilibre entre l'apport en oxygène et sa consommation. Les principaux facteurs en cause sont les anomalies de structure et fonction des microvaisseaux qui alimentent la tumeur, une augmentation de la distance de diffusion entre les vaisseaux sanguins et les cellules tumorales et une capacité réduite du transport de l'oxygène. (Hockel and Vaupel 2001)

Hypoxie intermittente et hypoxie chronique

Au sein d'une tumeur, nous pouvons retrouver deux types d'hypoxie provoquée par deux causes différentes: des limitations permanentes dans la diffusion de l'oxygène et des limitations transitoires dans la perfusion sanguine (Figure 5).

Les limitations permanentes dans la diffusion de l'oxygène résultent en le développement de zones hypoxiques dans des régions éloignées des vaisseaux sanguins. En effet, au fur et à mesure que la tumeur croît, les cellules en son centre s'éloignent petit à petit des vaisseaux sanguins et lorsque la distance entre les cellules tumorales et le vaisseau sanguin devient trop importante, l'oxygène ne peut plus parvenir aux cellules. Généralement, l'oxygène diffuse de 100 à 150 µm à partir des vaisseaux sanguins dans les tissus normaux ou malins. A des distances plus grandes, la tension en oxygène devient égale à zéro ou proche de zéro, et les cellules peuvent-être exposées à ce niveau d'hypoxie pendant plusieurs heures. Ces cellules sont alors dites dans un état d'hypoxie chronique. (Brown 1990)

Par contre, des arrêts transitoires dans le flux sanguin ou des variations temporelles dans le flux des microvaisseaux résultent en le développement de zones hypoxiques en aval des anomalies de perfusion des vaisseaux. Les cellules présentes dans ces zones sont alors dans un état d'hypoxie intermittente et sont susceptibles de subir plusieurs périodes successives d'hypoxie de courte durée au cours de leur vie. Les cellules concernées sont aussi bien les cellules tumorales que les cellules endothéliales. La durée de ces périodes a été montrée comme variant de moins d'une minute à plusieurs heures. (Rofstad, Galappathi et al. 2007)

Face à ces situations hypoxiques, les cellules ont développé des mécanismes d'adaptation impliquant l'angiogenèse, l'activation de la glycolyse, l'augmentation du transport de glucose qui confèrent aux cellules des avantages de croissance et de survie dans des conditions d'hypoxie.

L'adaptation à de faibles concentrations en oxygène dans les cellules et les tissus mène en effet à l'induction transcriptionnelle d'une série de gènes qui participent à ces mécanismes d'adaptation. Le facteur principal médiant cette réponse est HIF-1, un facteur de transcription senseur de l'oxygène.

Le facteur de transcription HIF-1

Structure

Le facteur de transcription HIF-1 est une protéine hétérodimérique composée d'une sous-unité α dont l'expression est fortement régulée, en particulier par l'oxygène, et d'une sous-unité exprimée de façon constitutive.

Chacune des deux sous-unités contient deux domaines caractéristiques: un domaine basic-helix-loop-helix (bHLH) et PAS (Ruas and Poellinger 2005) (Figure 6). Les domaines bHLH et PAS sont nécessaires à la formation de l'hétérodimère entre la sous-unité α et la sous-unité ainsi que pour la liaison à l'ADN.

Ce facteur de transcription permet aux cellules des eucaryotes supérieurs de s'adapter aux baisses de pression en oxygène en modulant l'expression d'un certain nombre de gènes.

Parmi les gènes cibles de HIF-1 identifiés à ce jour, sont retrouvés des gènes impliqués dans l'angiogenèse, l'érythropoïèse, la prolifération et la viabilité cellulaires ainsi que dans le métabolisme du fer et du glucose. (Brahimi-Horn and Pouyssegur 2006)

Trois isoformes de la sous-unité α du facteur de transcription HIF-1 ont été identifiées. Il s'agit de HIF-1 α , HIF-2 α et HIF-3 α . HIF-1 α est l'isoforme la mieux caractérisée.

Régulation de HIF-1 α

La régulation de l'activité de HIF-1 concerne principalement la sous unité alpha et a lieu à différents niveaux: stabilisation de la protéine, modifications post-traductionnelles, translocation nucléaire, dimérisation, activation transcriptionnelle et interaction avec d'autres protéines. Cependant, en condition de normoxie, la suppression de l'activité de HIF-1 résulte principalement de la dégradation de HIF-1 α . (Zagorska and Dulak 2004)

Le turn-over de HIF-1 α est très rapide, résultant en une protéine essentiellement non détectable en normoxie. Lorsque de l'oxygène est présent, deux réactions enzymatiques différentes résultent en l'ajout d'oxygène sur des résidus spécifiques de la sous-unité HIF-1 α . Ces réactions enzymatiques sont l'hydroxylation de deux résidus proline (Pro402 et Pro564) et l'hydroxylation d'un résidu asparaginyll. L'hydroxylation des deux résidus proline permet à HIF-1 α d'interagir avec le domaine beta d'une protéine nommée pVHL (von Hippel Lindau). La protéine suppressive de tumeur von Hippel Lindau est un composant d'un complexe E3 ubiquitine protéine ligase contenant les élongines B et C, Cul2 et Rbx1.

La protéine VHL médie via une polyubiquitinylation, la dégradation de HIF-1 α par le protéasome (Figure 7).

D'autre part, l'hydroxylation d'un résidu asparaginyll de HIF-1 α par l'asparaginyll hydroxylase a des conséquences complètement différentes : cette hydroxylation empêche l'interaction du coactivateur p300 avec HIF-1 α , interaction nécessaire à son activité transcriptionnelle. En normoxie, HIF-1 n'est donc pas actif.

Ces réactions assurent donc le mécanisme de senseur à l'oxygène à travers lequel la concentration d'oxygène moléculaire gouverne à la fois la destruction et la transactivation de HIF-1 α . (Maxwell 2004)

Par contre, lorsque la cellule est exposée à l'hypoxie, HIF-1 α va être rapidement stabilisé dû à l'absence d'hydroxylation des résidus proline. Il peut dès lors transloquer dans le noyau grâce à la présence d'une séquence signal de localisation nucléaire. Une fois dans le noyau, il va dimériser avec la sous unité HIF-1 β , se lier au site HRE (Hypoxia Response Element) présent dans le promoteur de ses gènes cibles et activer leur transcription (Figure 8).

Cependant, la translocation nucléaire en elle-même n'est pas suffisante pour entraîner l'expression des gènes cible de HIF-1.

D'autres mécanismes semblent impliqués dans l'activation de HIF-1. En effet, la cascade d'activation de HIF inclut la phosphorylation de HIF-1 α , la translocation nucléaire, la dimérisation avec l'ARNT et le recrutement de cofacteurs transcriptionnels.

Chacune de ces étapes peut-être sous le contrôle de la concentration en oxygène mais aussi d'autres facteurs environnementaux.

Des données récentes montrent que la phosphorylation joue un rôle important dans l'activation de HIF-1 α . La phosphorylation est secondaire à la stabilisation hypoxique et semble requise pour réguler l'activité transcriptionnelle de HIF-1.

ARNT joue aussi un rôle important dans l'activité de HIF-1. Il sert de partenaire d'hétérodimérisation de HIF-1 α . Bien qu'ARNT ne soit pas nécessaire à la translocation de HIF-1 α dans le noyau, la formation de l'hétérocomplexe HIF1 permet la liaison à l'ADN.

Enfin, des coactivateurs de l'activité transcriptionnelle permettent de réguler l'activité transcriptionnelle proprement dite de HIF-1. Il s'agit des protéines nucléaires CBP et p300. D'une part, ces cofacteurs participent au recrutement de la machinerie de transcription (ARN polymérase II). D'autre part, ils possèdent une activité acétyl transférase soit permettant de modifier la topologie de l'ADN par l'acétylation des histones, soit d'acétyler directement des facteurs de transcription. (Wenger 2002) La régulation de l'activité de HIF-1 nécessite donc de nombreuses étapes successives.

Réponses cellulaires à l'hypoxie

Les réponses adaptatives des cellules face à l'hypoxie sont très nombreuses. L'activation de HIF1 induit l'expression de gènes qui permettront aux cellules de résister à l'hypoxie et de s'y

adapter. Les réponses cellulaires à l'hypoxie incluent l'érythropoïèse, le métabolisme du fer, le métabolisme du glucose, l'angiogenèse, l'activation de signaux de survie cellulaire (Figure 9).

Tout d'abord, en réponse à l'hypoxie, la capacité de transport de l'oxygène est augmentée suite à une production accrue de globules rouges par l'expression de gènes impliqués dans l'érythropoïèse et le métabolisme du fer. L'hypoxie stimule l'expression de l'érythropoïétine qui est nécessaire à la formation des globules rouges. Une augmentation du nombre de globules rouges favorise ainsi le transport de l'oxygène vers les tissus. De plus, pour la formation de l'hème, du fer est nécessaire. L'hypoxie augmente aussi l'expression de la transferrine, qui transporte le fer (Fe^{3+}) aux cellules.

L'expression de nombreux gènes impliqués dans les différentes étapes de l'angiogenèse a également été montrée comme s'élevant en réponse à l'hypoxie. Parmi ces gènes, nous retrouvons le VEGF, qui participe à l'angiogenèse en recrutant les cellules endothéliales et en favorisant leur prolifération et leur migration. L'induction du VEGF ainsi que d'autres facteurs proangiogènes mène à l'augmentation de la densité vasculaire et ainsi à la diminution de la distance de diffusion de l'oxygène.

Aussi, en condition d'hypoxie, les cellules utilisent de manière majoritaire la glycolyse pour générer l'ATP dont elles ont besoin. La glycolyse ne procure que deux ATP par molécule de glucose alors que la chaîne respiratoire fournit 38 ATP. HIF-1 régule l'expression de nombreuses enzymes impliquées dans la voie glycolytique ainsi que de transporteurs de glucose afin d'augmenter le flux glycolytique et donc la production d'ATP en anaérobie.

Finalement, l'hypoxie et HIF-1 stimulent également la production de facteurs de croissance tels que l'IGF2 et le TGF α . La liaison de ces facteurs à leurs récepteurs respectifs active des voies de signalisation menant à la prolifération et la survie cellulaire et stimule l'expression de HIF-1 α lui-même. La cellule peut ainsi s'adapter aux conditions défavorables de son environnement. (Giaccia, Simon et al. 2004; Lee, Bae et al. 2004)

3. Le stress oxydatif

Principe

De nombreux organismes sont constamment exposés à l'oxygène moléculaire, il est même nécessaire pour la vie de beaucoup d'entre eux. Cependant, l'oxygène n'est pas complètement inoffensif et peut être toxique pour les organismes, incluant l'homme.

Les espèces oxygénées réactives (ROS) proviennent du métabolisme de l'oxygène moléculaire. L'appellation "dérivés réactifs de l'oxygène" inclut l'anion superoxide, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singulet (1O_2) et les radicaux hydroxyl ($\bullet\text{OH}$) (Figure 10).

Il existe différents mécanismes par lesquels les ROS peuvent être générés incluant notamment la respiration aérobie, la synthèse d'oxyde nitrique et la voie de la NADPH oxydase durant l'inflammation.

Lors de la respiration aérobie, la chaîne respiratoire mitochondriale produit des ROS au cours du transfert des électrons d'un transporteur à l'autre. Durant ce processus, certains électrons peuvent échapper à la chaîne de transport des électrons et interagir avec l'oxygène pour générer de l' $\text{O}_2\bullet^-$, $\text{OH}\bullet$ ou H_2O_2 .

L'enzyme nitrique oxyde synthase produit quant à elle de l'oxyde nitrique via la désamination de L-arginine ou L-citrulline. L'oxyde nitrique n'est lui-même pas très réactif mais il peut interagir avec d'autres intermédiaires tels que l'oxygène, $\text{O}_2\bullet^-$,... Par exemple, la combinaison

de NO avec l' $O_2^{\bullet-}$ forme du peroxynitrite (ONOO⁻), qui est une espèce très réactive qui peut causer l'inactivation des protéines.

Finalement, les cellules inflammatoires peuvent utiliser le complexe NADPH oxydase pour générer des radicaux oxygénés incluant l' $O_2^{\bullet-}$ et l' H_2O_2 dans le but de tuer des bactéries ainsi que d'autres pathogènes.

En plus de ces mécanismes biologiques de génération de ROS, il existe également des sources exogènes de radicaux libres incluant la fumée de cigarette, les polluants tels que l'ozone, les radiations,...

L'hypoxie et la réoxygénation sont deux éléments clés de l'hypoxie intermittente. Il a été démontré que l'hypoxie et la réoxygénation induiraient également la production de ROS. Les oxydants sont produits en excès lors de la réoxygénation mais la production de ROS pourrait également augmenter lors de l'hypoxie. (Li and Jackson 2002)

Les ROS sont produits normalement dans toutes les cellules aérobies, mais la présence d'antioxydants biochimiques permet de les neutraliser et de maintenir ainsi un équilibre.

Le stress oxydatif se produit lorsque cet équilibre est rompu, dû à un excès de production de ROS, à une diminution en antioxydants ou aux deux.

Chacun des ROS est très réactif et instable dû au fait qu'ils contiennent un électron non apparié. Cela leur donne la capacité d'interagir rapidement avec des macromolécules telles que les protéines, les lipides et les acides nucléiques. Dès lors, quand les cellules sont incapables de remplacer ou d'éliminer ces macromolécules oxydées, un dysfonctionnement cellulaire peut avoir lieu.

Le radical hydroxyl est connu pour réagir avec tous les composants de la molécule d'ADN endommageant à la fois les bases purines et pyrimidines. Des modifications permanentes du matériel génétique résultant de ces dommages oxydatifs représentent la première étape impliquée dans la mutagenèse, la carcinogenèse et le vieillissement. (Valko, Leibfritz et al. 2007)

L'oxydation de l'ADN peut également causer des cassures simple ou double brin et altérer les interactions ADN-protéines et ADN-ADN.

Aussi, l'oxydation des protéines peut causer des changements dans la structure des acides aminés, des augmentations de l'hydrophobicité des protéines et des pertes d'activité enzymatique. Les protéines exerçant des rôles vitaux dans la régulation de la structure cellulaire, la signalisation cellulaire, et de nombreux procédés enzymatiques, nous comprenons aisément que l'oxydation des protéines peut rapidement contribuer à la perte de viabilité cellulaire lors des stress oxydatifs.

Les protéines oxydées sont normalement reconnues et dégradées par des protéases intracellulaires, telles que le protéasome. Cependant, il semblerait que les radicaux libres peuvent réagir avec ces complexes protéolytiques induisant une diminution de leur fonctionnalité. (Cecarini, Gee et al. 2007)

L'exposition aux radicaux libres d'une variété de source a conduit les organismes à développer une série de mécanismes de défense. Les mécanismes de défense contre le stress oxydatif induit par les radicaux libres impliquent des mécanismes de prévention, des mécanismes de réparation, des défenses antioxydantes,...

Chez les mammifères, environ vingt éléments régulateurs sensibles à l'oxydation ont été décrits. Ils sont responsables de changements dans le rapport des pro- et antioxydants résultant en le développement de stress oxydatif.

Dépendant du niveau de ROS, différents facteurs de transcription sont activés et coordonnent différentes réponses biologiques. Un faible stress oxydatif induit Nrf2, un facteur de transcription impliqué dans l'activation de gènes codant pour des enzymes antioxydantes. D'autre part, une

quantité intermédiaire de ROS déclenche une réponse inflammatoire par l'activation de NF- κ B et de AP-1. Finalement, un niveau élevé de stress oxydatif entraîne une perturbation du pore de perméabilité transitoire mitochondrial et la disruption du transfert d'électrons résultant alors en la mort cellulaire par nécrose ou apoptose.(Gloire, Legrand-Poels et al. 2006) (Figure 11)

L'activation des facteurs de transcription Nrf2, NF- κ B, AP-1 influence l'expression de plusieurs centaines de gènes et donc de l'activité de nombreux processus métaboliques. Ces facteurs sont des régulateurs clés de la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose mais aussi de la défense des cellules contre ces agents perturbateurs.

Le facteur de transcription Nrf2

Les espèces oxygénées réactives (ROS) et les électrophiles causent des dommages cellulaires menant à de nombreuses maladies incluant les cancers, les maladies auto-immunes et les maladies neurodégénératives.

Certaines particules toxiques sont normalement détoxifiées par des enzymes détoxifiantes de phase 2 et des protéines antioxydantes. L'élément de réponse antioxydant (ARE), qui régule de manière transcriptionnelle des gènes codant pour ces enzymes de détoxification et ces protéines antioxydantes joue un rôle primordial dans la régulation de l'expression de ces systèmes de défense cellulaire.(Lyakhovich, Vavilin et al. 2006) Il fait intervenir une protéine appelée Nrf2.

Structure

Nrf2 est une protéine de 67 kD. Elle consiste en 605 résidus acides aminés qui forment six domaines très conservés: Neh1-Neh6. Neh2 est un domaine responsable de la régulation négative de Nrf2 par sa liaison avec une protéine Keap1. Les domaines Neh4 et Neh5 médient la transactivation de Nrf2 en liant des coactivateurs transcriptionnels (CBP/p300)(Figure 12). Nrf2 est un facteur de transcription de la famille des leucine zipper. De nombreuses études ont démontré que Nrf2 était impliqué dans la protection de différents tissus contre le stress oxydatif et ont établi le mécanisme moléculaire par lequel Nrf2 est activé et participe à l'expression des gènes qui présentent le site ARE dans leur promoteur.

Régulation de Nrf2

Des recherches sur les mécanismes régulateurs gouvernant l'activité de Nrf2 ont mené à l'identification d'une protéine appelée Keap1. Keap1 réprime l'activité de Nrf2 en se liant directement au domaine Neh2 de NRF2. Keap1 est constituée de 5 domaines: la région N-terminal (NTR), la région C-terminale (CTR), le domaine BTB, IVR et DGR. Lors d'analyses de la structure et de la fonction de ces domaines, il a été démontré que Keap1 interagit avec des filaments d'actine via le domaine DGR et que cette interaction est cruciale pour l'activité de Keap1. Ce domaine permet également la liaison de Keap1 à la région Neh2 de Nrf2. Les domaines IVR et CTR quant à eux sont essentiels pour permettre à Keap1 de retenir Nrf2 dans le cytoplasme.

En conditions basales, Keap1 associée avec le cytosquelette d'actine, se lie à Nrf2 via sa région Neh2, ancre ce facteur de transcription dans le cytoplasme, le cible pour l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome, réprimant ainsi l'activité de Nrf2 à induire l'expression de ses gènes cibles. Dans cette situation, Keap1 semble avoir deux rôles

fonctionnels: elle agit comme une molécule senseur du stress oxydatif et sert également d'adaptateur entre une protéine Cullin 3 (E3 ligase) et Nrf2 régulant ainsi la stabilité de Nrf2.

Suite à un stress oxydatif, les inducteurs dissocient le complexe Keap1-Nrf2, permettant à Nrf2 de transloquer dans le noyau où, en combinaison avec d'autres petites protéines (Maf), il se lie à l'élément de réponse antioxydant (ARE) et augmente la transcription de gènes codant pour des enzymes de détoxification (Figure 13). Cependant, les mécanismes moléculaires précis de la séparation de Nrf2 de la protéine Keap1 lors d'un stress oxydatif restent à élucider. Actuellement différentes hypothèses sont proposées.

Une première explication de l'accumulation nucléaire de Nrf2 serait que les inducteurs disruptent le complexe Keap1-Nrf2 en modifiant 2 (C273 et C288) des 25 résidus cystéines de Keap1. Les inducteurs des gènes de phase 2 font partie de 9 classes distinctes mais partagent des propriétés communes. Ils peuvent notamment tous modifier des groupements thiol (SH) par alkylation, oxydation ou réduction.

Cela suggère que Keap1 est un senseur du stress oxydatif qui possède des résidus cystéines réactifs qui sont reconnus et modifiés chimiquement par les inducteurs.

En conditions basales, Keap1 existerait sous forme d'un dimère dans lequel deux monomères sont liés l'un à l'autre, probablement par des interactions hydrophobes via leurs domaines BTB. Les cystéines 273 et 288 de la région IVR se trouvent alors dans un état réduit (SH).

Dans cette conformation, Keap1 séquestre une molécule de Nrf2 dans le cytoplasme entre ses deux domaines DGR et permet son rapide turnover en le ciblant vers le protéasome.

Suite à l'exposition au stress oxydatif, les résidus C273 et C288 formeraient des ponts disulfures intermoléculaires. Cela entraînerait alors un changement de conformation de Keap1 et la conformation résultante libérerait Nrf2, permettant sa translocation dans le noyau et son activité transcriptionnelle (Figure 14). (Wakabayashi, Dinkova-Kostova et al. 2004)

Bien que l'on pensait auparavant que l'activation de Nrf2 était uniquement régulée par l'inhibition de son importation nucléaire, de plus en plus de preuves montrent que l'abondance de la protéine Nrf2 est maintenue à de faibles niveaux par une dégradation médiée par le protéasome.

Le fait que Keap1 soit impliqué à la fois dans la séquestration cytoplasmique de Nrf2 et la protéolyse, suggère un modèle dans lequel l'activation de Nrf2 est étroitement régulée par la protéolyse dans le compartiment cytoplasmique. En effet, Keap1 fonctionne comme un adaptateur permettant le pontage entre Nrf2 et une protéine Cullin 3 (E3 ligase). Dès lors, un modèle alternatif expliquant l'accumulation de Nrf2 lors d'un stress oxydatif fut proposé, dans lequel, les agents oxydatifs affecteraient la dégradation de Nrf2 médiée par Keap1. Ils ont remis en question le modèle de disruption directe entre Keap1 et Nrf2 car ils ont découvert que Keap1 se liait avec une grande affinité au domaine Neh2 de Nrf2.

Les résidus cystéines ne moduleraient donc pas l'association ou la dissociation de Nrf2 de Keap1, mais les oxydants activeraient Nrf2 en altérant la voie de dégradation de Nrf2 médiée par Keap1. (Eggler, Liu et al. 2005)

Certains pensent également que dans des conditions de stress oxydatif où Nrf2 est libéré de la répression Keap1, Nrf2 est encore sujet à la dégradation par le protéasome, indiquant l'existence d'une dégradation de Nrf2 indépendante de Keap1.

Ils ont dès lors émis l'hypothèse qu'il existait peut-être deux modes de dégradation de Nrf2:

- Une dégradation de Nrf2 dépendante de Keap1 en conditions normales (homéostasie).
- Une dégradation de Nrf2 indépendante de Keap1 en conditions de stress oxydatif.

(Itoh, Tong et al. 2004)

Il semblerait finalement qu'une protéine kinase C (PKC) soit également impliquée. En effet, la PKC entraînerait la phosphorylation de Nrf2 au niveau d'un résidu Sérine (Ser-40) et faciliterait ainsi sa libération de Keap1. Cette étape représenterait une étape critique dans l'induction de la translocation nucléaire de Nrf2 en réponse au stress oxydatif (Huang, Nguyen et al. 2002).

Quelques gènes cibles de Nrf2

De nombreuses études ont montré que Nrf2 joue un rôle important dans la protection des cellules face au stress oxydatif. Les cellules utilisent de nombreuses stratégies antioxydantes pour contrôler leur niveau d'espèces réactives de l'oxygène. Une de ces stratégies est de nature enzymatique, visant à détruire les superoxydes et peroxydes. Ainsi, Nrf2 régule l'expression de gènes codant pour un grand nombre de protéines antioxydantes et d'enzymes de détoxification de phase 2 incluant la NADPH quinone oxidoréductase (NQO1), l'hème oxygénase (HO-1), la glutathione S-transférase (GST), la glutamate cystéine ligase (GCS) et la ferritine.

De nombreux gènes régulés par Nrf2 sont dépendants du glutathion. Le glutathion est un composé qui joue un rôle central dans la défense contre le stress oxydatif. Le glutathion (GSH) est l'antioxydant le plus puissant qui existe à l'état naturel dans les cellules du corps. Grâce à son important pouvoir réducteur, le GSH contribue au recyclage d'autres antioxydants ayant subi une oxydation.

Des gènes tels que les Glutathione S-transférases (GSTs) sont des composants importants de la défense antioxydante contre les métabolites réactifs formés lors du stress oxydatif. Ces enzymes métabolisent de nombreux composés électrophiles endogènes et exogènes en les conjuguant avec le glutathion. Cela augmente leur solubilité, et donc facilite l'élimination de ces conjugués des cellules.

D'autres enzymes dépendantes du glutathion telles que la glutathione peroxydase, la peroxyrédoxine et la glutathione transférase voient également leur expression augmentée par Nrf2. La glutathione peroxydase et la peroxyrédoxine métabolisent H_2O_2 , générant de l' H_2O et du glutathion oxydé. Du glutathion réduit est régénéré par la suite grâce à la glutathione réductase.

Un autre gène dont l'expression est régulée par Nrf2 est également très important dans la défense cellulaire contre le stress oxydatif. Il s'agit de HO-1. L'hème oxygénase-1 (HO-1) est une enzyme responsable de la dégradation de l'hème en bilirubine, monoxyde de carbone et fer.

Finalement, la quinone oxydoréductase (NQO1) est également importante dans la détoxification des quinones. Elle catalyse la réduction de la quinone par le transfert d'un hydrogène du NAD(P)H. (Lyakhovich, Vavilin et al. 2006)

4. Le facteur de transcription NF- κ B

Le facteur de transcription NF- κ B est un régulateur crucial de nombreux processus physiologiques et pathologiques, incluant les réponses immunitaires innées et adaptatives, l'inflammation, la prolifération, la tumorigénèse et l'apoptose.

Il est activé par une variété de stimuli allant des cytokines à différentes formes de radiations et au stress oxydatif.

Tel qu'expliqué précédemment, un niveau plus élevé de ROS intracellulaires entraîne un stress oxydatif. Les cellules répondent à ces conditions défavorables en modulant les niveaux d'antioxydants et en induisant l'expression de gènes codant pour des enzymes antioxydantes. Il est suggéré que le taux intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène régule l'activité de NF- κ B en plus de celle de Nrf2. Un faible stress oxydatif permettrait d'activer NRF2 tandis que des quantités intermédiaires de ROS entraîneraient l'activation de NF- κ B (Figure 11). Ne sachant pas exactement dans laquelle de ces catégories (faible ou intermédiaire) se situe la quantité de ROS produite au cours de l'hypoxie intermittente, nous avons décidé d'étudier l'activité de chacun de ces facteurs de transcription. Cependant, le mécanisme moléculaire impliqué dans l'activation de ces facteurs de transcription par les ROS n'est pas encore tout à fait élucidé. (Li and Karin 1999)

Structure

Les facteurs de transcription NF- κ B sont composés d'homodimères ou d'hétérodimères de protéines Rel. Cette famille est constituée de 5 membres: NF- κ B1 (p105 et p50), NF- κ B2 (p100 et p52), c-Rel, RelB et RelA (p65). Chacun des membres de cette famille contient une région appelée le domaine d'homologie Rel (RHD). Le domaine RHD a une longueur d'environ 300 acides aminés et est nécessaire pour la liaison à l'ADN, la dimérisation, la localisation nucléaire et l'interaction avec les protéines inhibitrices. (Hayden and Ghosh 2004)

Régulation de NF- κ B

Dans la cellule, le facteur de transcription NF- κ B est séquestré par une protéine appelée I κ B (ankyrin rich Inhibitory kappa B protein) qui cache par sa liaison, la séquence de liaison à l'ADN et la séquence de localisation nucléaire de NF- κ B. Ce complexe NF- κ B/I κ B est localisé dans le cytoplasme. Actuellement, 7 protéines I κ B ont été identifiées. Elles contiennent toutes de multiples copies de séquences de 30 à 33 acides aminés appelées des répétitions de l'ankyrine qui médient l'association entre I κ B et les dimères NF- κ B. Les répétitions de l'ankyrine interagissent avec le domaine RHD des protéines NF- κ B et masquent dès lors leur signal de localisation nucléaire, empêchant ainsi la translocation.

Le processus d'activation de NF- κ B, induit par des stimuli comme le TNF α (Tumor Necrosis Factor) l'interleukine 1, les espèces oxygénées réactives,... est basé sur des phosphorylations d'I κ B aboutissant à la dégradation d'I κ B, entraînant ainsi la dissociation du complexe et par conséquent, la libération de NF- κ B. Les dimères NF- κ B peuvent alors entrer dans le noyau et induire l'expression de leurs gènes cibles.

Les enzymes qui catalysent l'ubiquitination de I κ B sont constitutivement actives. Cependant, l'étape qui dicte le sort de I κ B et donc de NF- κ B est, dans la plupart des cas, la phosphorylation de la molécule I κ B. Cette phosphorylation permet alors l'ubiquitylation d'I κ B et sa dégradation par le protéasome. Ni la phosphorylation, ni l'ubiquitination seule ne sont suffisantes pour dissocier le complexe NF- κ B-I κ B. La libération de NF- κ B n'est permise que suite à la dégradation de I κ B. (May and Ghosh 1998)

Il existe cependant des exceptions à cette voie d'activation de NF- κ B. Un exemple est l'activation de NF- κ B en réponse aux radiations UV, laquelle, bien que dépendante de la dégradation d'I κ B n'implique pas de phosphorylation.

La plupart des inducteurs de NF- κ B transmettent leurs signaux intracellulaires via des voies différentes. Il doit cependant exister un point de convergence où s'entrecroisent ces différentes voies. Il s'avère que l'élément permettant cette convergence est une kinase IKK (I κ B kinase) responsable de la phosphorylation de I κ B. IKK est constituée de trois sous-unités. Deux de ces polypeptides, IKK α et IKK β , servent de sous-unités catalytiques tandis que IKK γ sert de sous-unité régulatrice.(Perkins 2007)

Deux voies distinctes d'activation de NF- κ B ont été caractérisées (Figure 15). Elles résultent en l'activation de NF- κ B via des kinases distinctes.(Xiao 2004)

La voie la plus fréquemment observée est la voie classique. Celle-ci est induite par une variété de stimuli incluant les cytokines proinflammatoires (TNF α et IL1), les récepteurs des cellules T (TCR) ou l'exposition à des produits bactériens tels que les LPS. Elle est principalement induite par la kinase IKK et utilise trois protéines I κ B (I κ B α , I κ B β et I κ B ϵ). Plus précisément, la stimulation des cellules par des inducteurs de NF- κ B résulte en la phosphorylation de I κ B- α au niveau de deux résidus sérine (Ser32 et Ser36). I κ B- α phosphorylé est alors ubiquitinylé sur deux lysines (Lys21 et Lys22), ce qui déclenche la dégradation rapide de la protéine par le protéasome 26S. Le dimère NF- κ B libéré dans cette voie est plus souvent p50/p65.

Le mécanisme d'activation alternatif est quant à lui utilisé par un nombre restreint de stimuli, notamment certains se fixant sur des récepteurs de la famille du TNF-R comme BAFF, la lymphotoxine ou CD40. La voie alternative est activée via la kinase IKK α et utilise la protéine p100 qui peut fonctionner comme une protéine I κ B.

NF- κ B a toujours été considéré comme un régulateur clé de la réponse immunitaire innée. Cependant, des études récentes ont montré que NF- κ B pouvait fonctionner de manière plus générale comme un régulateur central de réponse aux stress lors de différentes conditions stressantes telles que le stress physique, le stress oxydatif ainsi que l'exposition à certaines substances chimiques. On constate que l'induction de NF- κ B peut survenir dans de nombreuses cellules, par un très large ensemble d'agents stimulants. C'est pourquoi récemment, de nombreux scientifiques ont émis l'hypothèse que les stimuli capables d'activer NF- κ B le font en augmentant le stress oxydatif à l'intérieur de la cellule. Les scientifiques sont parvenus à cette conclusion car ils constatèrent que l'activation de NF- κ B était inhibée par une série d'antioxydants. Aussi, il fut observé que l'addition directe de H₂O₂ dans le milieu de culture des cellules provoquait l'activation de NF- κ B au sein de ces cellules. Finalement, il a été montré dans certains types cellulaires, qu'il y avait une augmentation de ROS en réponse à des agents qui activent NF- κ B (TNF, IL1,...). Toutes ces observations mises ensemble suggèrent que les ROS pourraient être impliqués dans l'activation de NF- κ B. Cependant, ce modèle n'est pas universel car ce lien entre l'activation de NF- κ B et la production de ROS ne fut observé que dans certaines lignées cellulaires.

Les études qui se sont focalisées sur l'activation de NF- κ B par les oxydants ont généralement utilisé du H₂O₂ comme source de ROS. Il s'avère que l'activation de NF- κ B par le H₂O₂ et par les ROS en général, est très spécifique du type cellulaire et implique des mécanismes

assez différents. C'est certainement la raison pour laquelle la régulation de NF- κ B par les ROS n'est pas encore totalement connue.

Les mécanismes menant à l'activation de NF- κ B par les radicaux libres ont été bien décrits dans deux types cellulaires : les cellules T et les cellules épithéliales (Figure 16).

Dans les cellules épithéliales, l' H_2O_2 active IKK via l'intermédiaire de PKD. Les ROS activent PKD via deux voies médiées par Src. Tout d'abord, Src activée entraîne la phosphorylation médiée par Abl de PKD au niveau d'un résidu tyrosine 463. Cette phosphorylation va faciliter une seconde étape qui consiste en une seconde phosphorylation au niveau de deux résidus sérines (S738 et S742), médiée cette fois par PKC δ . De cette façon, PKD est complètement activé et peut activer le complexe IKK au niveau de IKK. S'ensuit la phosphorylation de I κ B α au niveau de deux résidus sérine. I κ B est alors sujet à l'ubiquitinylation et à la dégradation par le protéasome, permettant la libération de NF- κ B.

Dans les cellules T, le mécanisme d'activation de NF- κ B par H_2O_2 semble relativement différent. Des études menées sur les cellules T Jurkat concernant l'activation de NF- κ B par les ROS ont en effet mis en évidence un mécanisme d'activation différent de celui déclenché par les cytokines proinflammatoires. Il implique la phosphorylation d'I κ B au niveau d'un résidu tyrosine 42. De nombreux scientifiques ont alors tenté de déterminer quelle était la kinase responsable de cette phosphorylation. Takada et al. ont montré que Syk pouvait être la tyrosine kinase terminale responsable de la phosphorylation de I κ B au niveau de la tyrosine 42 car cette kinase était requise pour la phosphorylation d'I κ B induite par l' H_2O_2 et l'activation de NF- κ B.

Dans les cellules T autres que Jurkat, il fut observé que l' H_2O_2 induisait l'activation d'IKK menant à la phosphorylation classique d'I κ B au niveau de deux résidus sérines. La différence qu'il existe entre ces cellules T et les cellules T Jurkat, c'est la présence d'une protéine Ship1. Les cellules T Jurkat sont en effet déficientes en l'expression de la protéine Ship1. Il fut cependant observé que des cellules T Jurkat Ship1 positives utilisaient le mécanisme d'activation classique dépendant de l'activation d'IKK et de la phosphorylation de I κ B au niveau de deux résidus sérines. Ces données suggèrent que la voie inhabituelle d'activation de NF- κ B décrite dans les cellules T Jurkat soumises au stress oxydatif est seulement valable dans ce type cellulaire et est une voie de secours adoptée par les cellules Ship1 négatives.

NF- κ B dans les autres cellules T est activé par le mécanisme classique dépendant d'IKK, et cette activation est liée à Ship1. Cependant, le mécanisme par lequel Ship1 active le complexe IKK reste à être déterminé. (Gloire, Legrand-Poels et al. 2006)

Il reste donc encore plusieurs questions non résolues concernant les mécanismes par lesquels le stress oxydatif mène à l'activation de NF- κ B et aux réponses cellulaires. Une compréhension plus complète de ces mécanismes pourrait fournir un meilleur aperçu des réponses physiologiques et pathologiques qui sont affectées par un stress oxydatif généré par des conditions présentes dans le vieillissement, l'inflammation, le cancer,...

Les gènes cibles de NF- κ B

NF- κ B est activé par de nombreux stimuli. Une fois activé, NF- κ B participe à la régulation de l'expression de nombreux gènes cibles dans différentes cellules.

Le facteur de transcription NF- κ B augmente l'expression d'environ 150 gènes cibles. NF- κ B se lie spécifiquement à des sites κ B présents dans le promoteur de ces nombreux gènes. Ces gènes codent pour des cytokines proinflammatoires (TNF α , IL1,...), des chémokines, des molécules d'adhérence et des peptides antimicrobiens (Zhang and Ghosh 2001).

NF- κ B présente une certaine dualité. Son activation peut parfois avoir des conséquences bénéfiques mais peut également être nuisible dans certaines circonstances. Cette dualité est principalement remarquable dans la relation avec le cancer.

NF- κ B joue en effet un rôle de régulation de l'expression de nombreuses cytokines. Les cytokines et leur récepteur correspondant sont des médiateurs clé du système immunitaire. Les cytokines telles que TNF- α et IFN- γ qui sont produites par les cellules Th1 par exemple, peuvent mener à l'activation et à la maturation des macrophages et des lymphocytes T qui sont spécialisés dans l'immunité cellulaire.

Cependant, de nombreuses cytokines qui sont régulées par NF- κ B ont été montrées comme étant des facteurs de croissance pour les cellules tumorales. De nombreux facteurs qui régulent l'angiogenèse ont également été montrés comme activés par NF- κ B. Ceux-ci regroupent des chimokines (IL-8, MCP-1) et des facteurs de croissance (TNF, VEGF) produits par les cellules inflammatoires.

L'activation de NF- κ B peut également médier la formation de métastases. En effet, la formation de métastases est médiée par l'expression de différentes molécules d'adhérence telles que ICAM-1, VCAM-1 et ELAM-1 dont l'expression est régulée par NF- κ B.

NF- κ B peut donc jouer un rôle critique dans le développement et l'évolution du cancer.

L'activation de NF- κ B est aussi étroitement liée à l'inhibition de l'apoptose, ce qui est probablement dû à la capacité de NF- κ B de réguler l'expression de gènes antiapoptotiques tels que TRAF1, TRAF2, c-IAP1,.... Cependant, bien que de nombreuses études lient NF- κ B avec la prévention de l'apoptose, NF- κ B est également renseigné comme ayant des fonctions proapoptotiques en augmentant l'expression des protéines Fas et FasL1.

Des stress physiques sous la forme d'irradiations ainsi que des stress oxydatifs peuvent également induire NF- κ B. Dans ce contexte, une variété de gènes de réponse au stress sont activés par NF- κ B. Au sein de ces gènes, nous retrouvons la synthase de l'oxyde nitrique inducible (iNOS) et la cyclooxygénase 2 (COX-2).

Les mécanismes par lesquels les produits de ces gènes participent à la réponse des cellules aux stress ne sont cependant pas encore bien connus.

Objectifs

Les thérapies anti-angiogéniques constituent un nouveau type de traitements contre le cancer qui visent à réduire l'agressivité tumorale en asphyxiant la tumeur. Elle empêche sa prolifération et limite le risque de métastases puisque la dissémination des cellules cancéreuses se fait principalement par voie sanguine. Cette nouvelle approche nécessite cependant une bonne connaissance des mécanismes qui régissent le comportement des cellules endothéliales. Une meilleure compréhension de ces mécanismes permettrait d'améliorer les thérapies visant les vaisseaux sanguins.

Il a été démontré que l'exposition des cellules endothéliales à des cycles d'hypoxie-réoxygénation rend non seulement les cellules résistantes aux stress proapoptotiques tels que la radiothérapie, mais favorise également leur capacité à migrer et à s'organiser en tubes. (Martinive, Defresne et al. 2006) L'hypoxie intermittente pourrait donc rendre les cellules endothéliales plus angiogéniques et donc favoriser le développement tumoral.

Les mécanismes par lesquels l'hypoxie intermittente affecte le comportement des cellules endothéliales ne sont cependant pas encore connus.

Le but de ce travail consiste donc à étudier les effets de l'hypoxie intermittente sur les cellules endothéliales afin de mieux comprendre les mécanismes à la base de la protection observée par Martinive et al et responsables du phénotype angiogénique de ces cellules.

Nous avons émis l'hypothèse que différents facteurs de transcription pouvaient être impliqués dans ce phénomène. L'hypoxie intermittente étant constituée de phases d'hypoxie suivies de réoxygénations, nous avons supposé que HIF-1 pouvait peut-être permettre une adaptation des cellules endothéliales lors des périodes d'hypoxie et jouer un rôle protecteur.

D'autre part, lors des périodes de réoxygénation, une production de radicaux libres pourrait avoir lieu. Cette possibilité nous a fait penser que, lors de ces phases de réoxygénation, deux autres facteurs de transcription, respectivement Nrf2 et NF- κ B pouvaient être activés.

Une première partie du mémoire a donc consisté en l'étude de l'activité de ces différents facteurs de transcription. Pour ce faire, la localisation, la liaison à l'ADN ainsi que l'activité transcriptionnelle de ces facteurs de transcription ont été étudiées. Nous avons aussi tenté de mettre en évidence la production de ROS.

La deuxième partie visait à mettre en évidence des variations d'expression de gènes induits dans les cellules endothéliales par l'hypoxie intermittente, ceci dans le but de mettre en évidence un éventuel phénotype angiogénique. Cela fut réalisé grâce à l'utilisation de microdamiers à ADN «DualChip human inflammation» ainsi qu'à l'aide de cartes microfluidiques. Une étude par RT PCR en temps réel a également été réalisée afin de confirmer les résultats obtenus avec les microdamiers.

L'ensemble des résultats devrait donc nous apporter une vue globale de la réponse des cellules endothéliales à l'hypoxie intermittente.

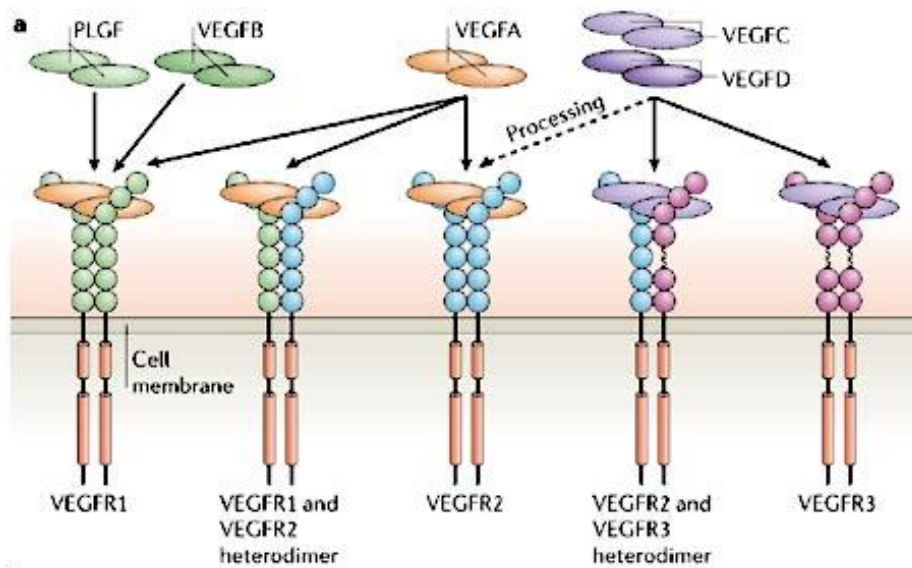


Figure 1: Les facteurs de croissance vasculaires endothéliaux (VEGF) se lient à trois récepteurs tyrosine kinase, menant à la formation de VEGFR homodimériques ou hétérodimériques.(Olsson, Dimberg et al. 2006)

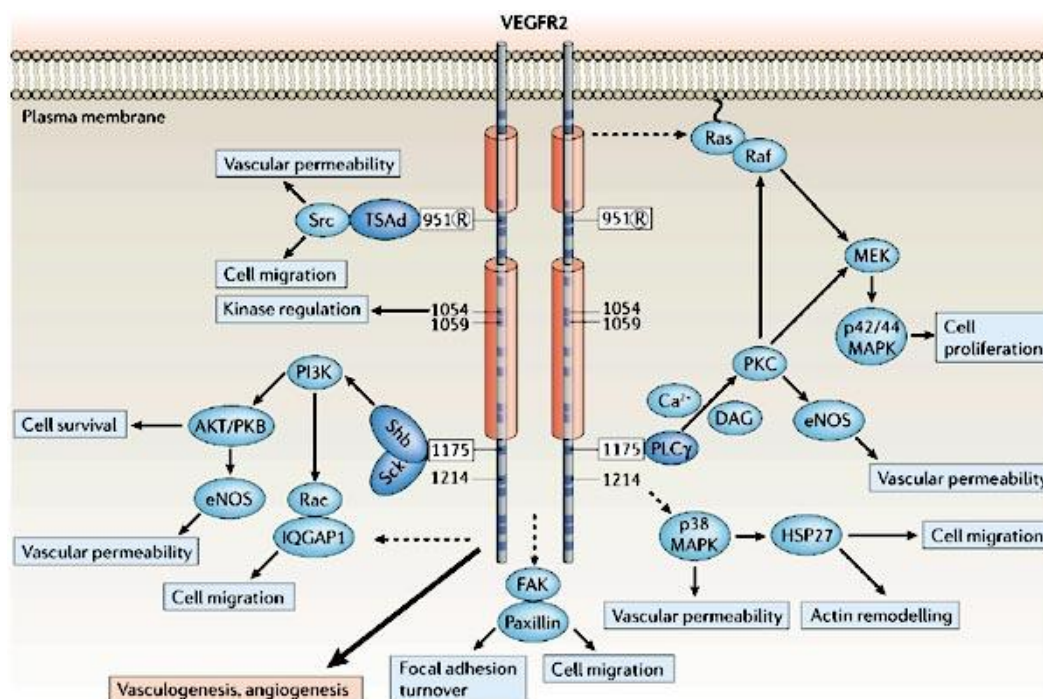


Figure 2: Shéma représentant les sites de phosphorylation du VEGFR2 et les voies de transduction du signal induites suite à la liaison du VEGF.(Olsson, Dimberg et al. 2006)

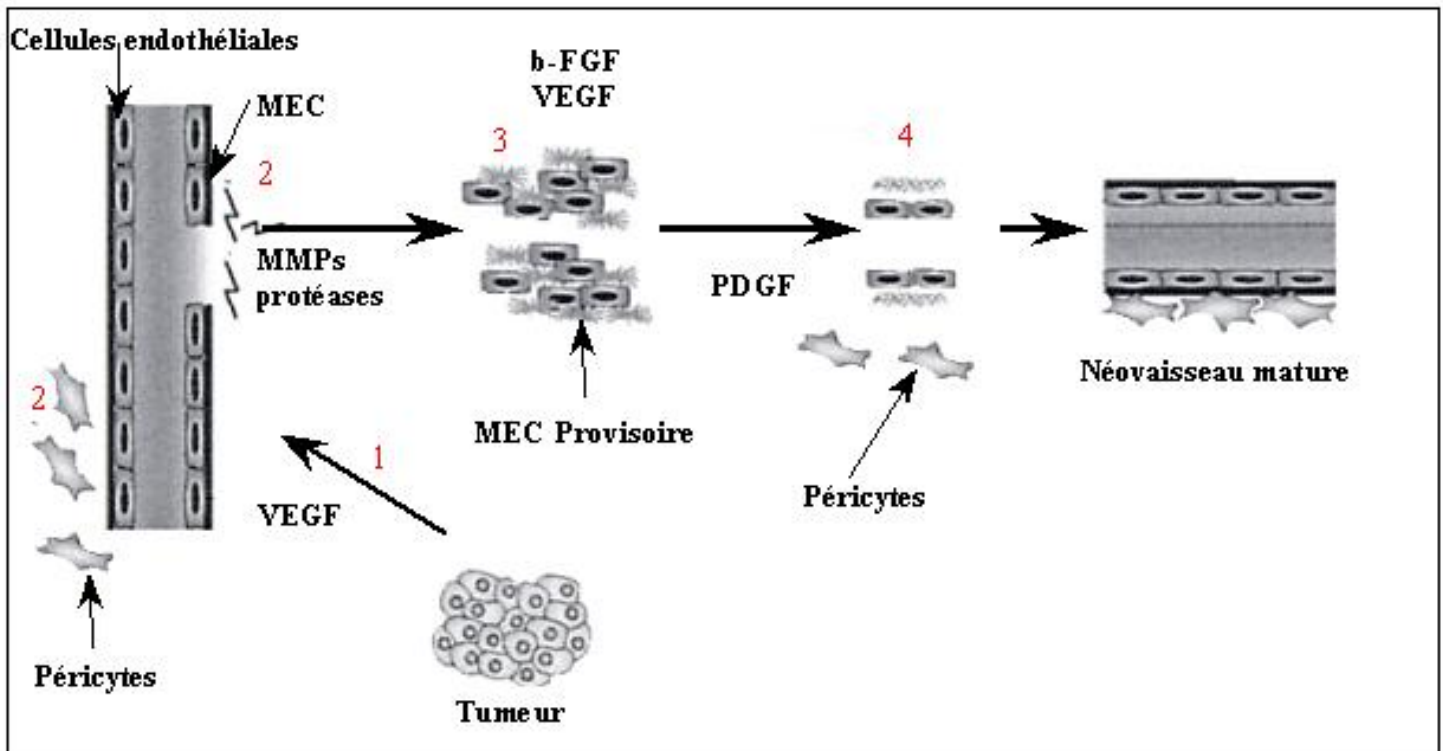


Figure 3 : Angiogenèse dans le développement du cancer.

L'hypoxie présente au sein de la tumeur entraîne l'activation de l'angiogenèse et permet à la tumeur de recruter les vaisseaux sanguins et de les stimuler pour former de nouveaux vaisseaux dans la tumeur. La vasculature tumorale fournit à la tumeur oxygène et nutriments, qui permettent alors une meilleure croissance de celle-ci. (Kalluri 2003)

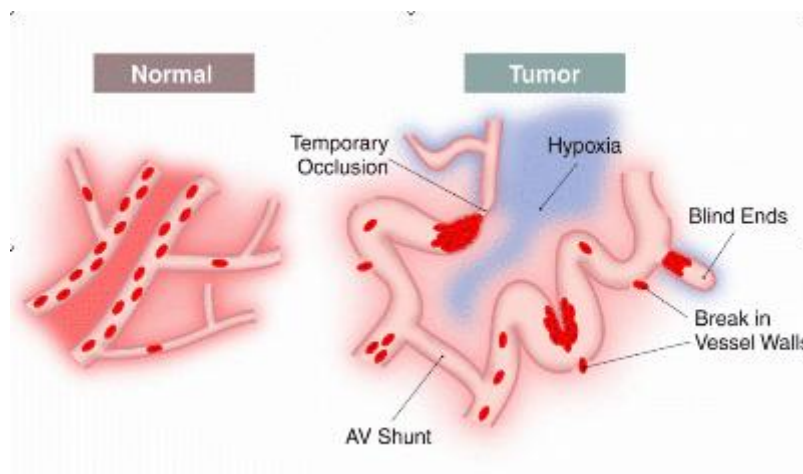


Figure 4 : Schéma représentant les différences existant entre la structure des vaisseaux normaux et la structure des vaisseaux tumoraux. (Brown and Giaccia 1998)

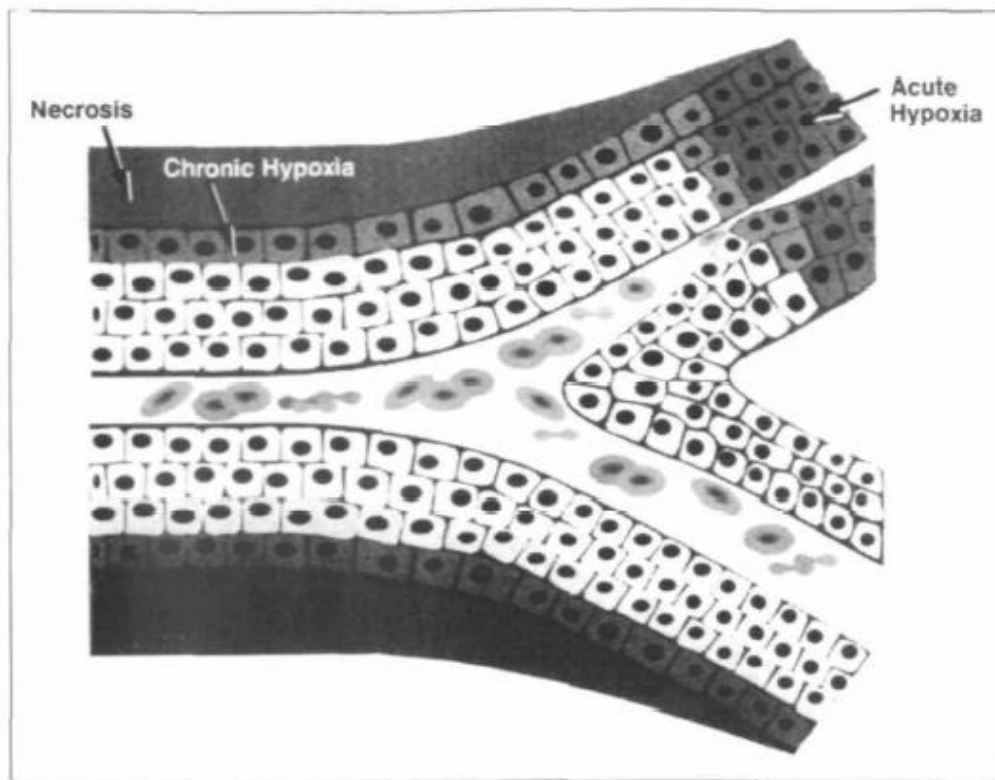


Figure 5 : Diagramme représentant l'hypoxie chronique et l'hypoxie intermittente dans une tumeur.(Brown 1990)

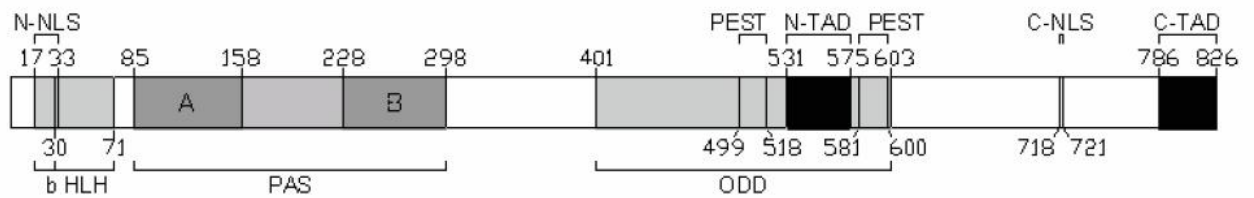


Figure 6 : Structure de HIF-1 α : Les nombres indiquent le premier et le dernier résidu amino acides de chaque domaine. Les principaux domaines sont : un domaine basic-helix-loop-helix (bHLH), un domaine d'homologie Per-AHR-ARNT-Sim (PAS), un domaine de dégradation dépendant de l'oxygène (ODD) et des domaines de transactivation (N-TAD et C-TAD). (Zagorska and Dulak 2004)

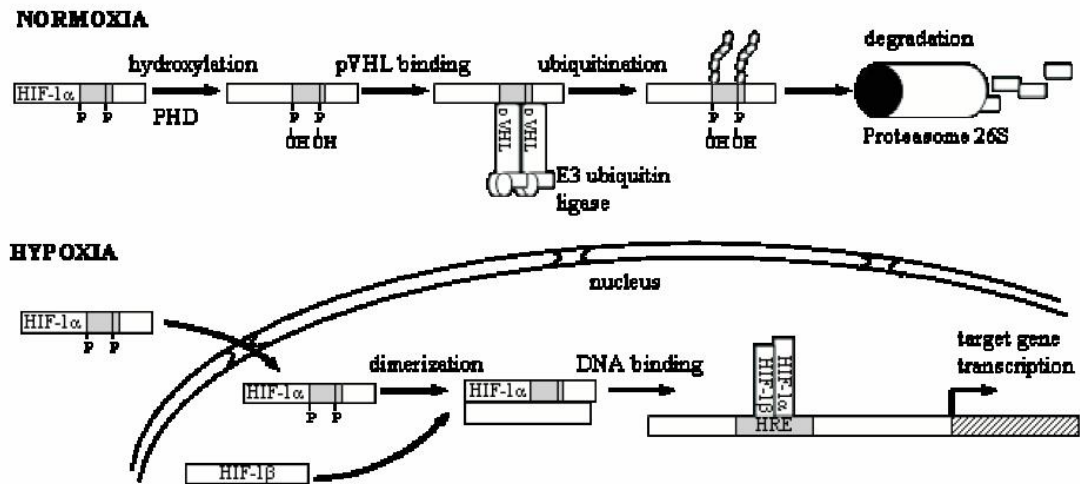


Figure 7 : Régulation de HIF-1 : En conditions de normoxie, des proline hydroxylases hydroxylent Pro 402 et Pro 564 dans le domaine ODD. Après l'hydroxylation, une protéine suppressive de tumeur (von Hippel Lindau) se lie au domaine ODD et recrute d'autres protéines pour former un complexe E3 ubiquitine ligase. HIF-1 α est dès lors ubiquitinylé et dégradé par le protéasome 26S. En conditions hypoxiques, les prolyl hydroxylases sont inactives, ce qui empêche la liaison de pVHL. Dès lors, HIF-1 α échappe à la dégradation, et peut être transporté dans le noyau où, après dimérisation avec HIF-1 β , il stimule la transcription de ses gènes cibles. (Zagorska and Dulak 2004)

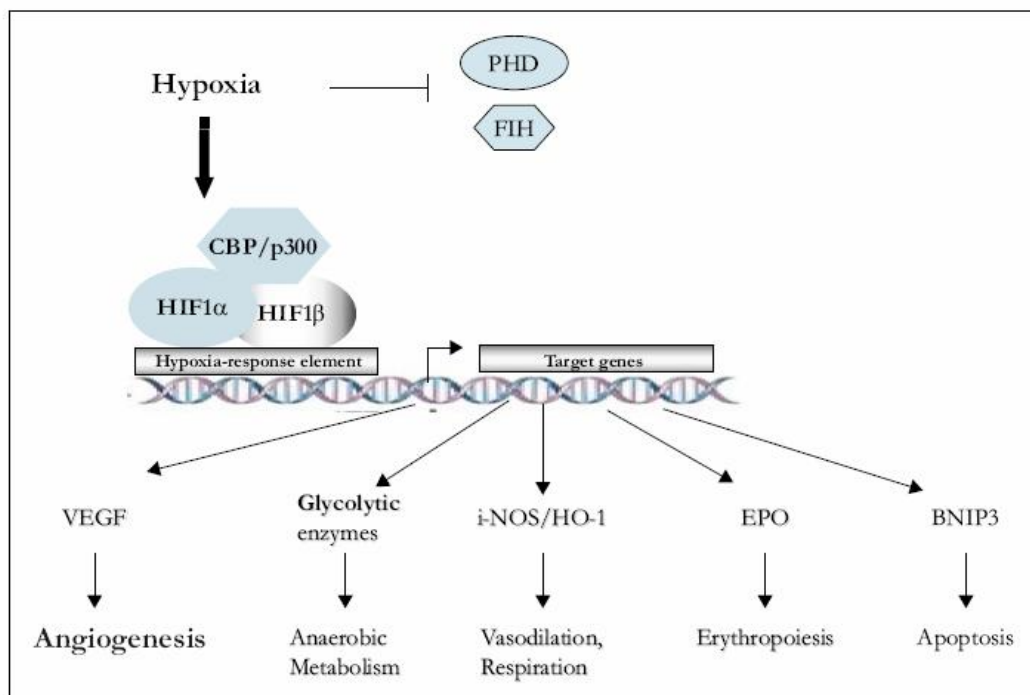


Figure 8 : En conditions hypoxiques, la sous-unité α de HIF-1 est stable et transloque dans le noyau où elle hétérodimérise avec la sous-unité β . S'ensuit la liaison au promoteur de ses gènes cibles portant un élément de réponse à l'hypoxie (HRE). L'interaction avec des cofacteurs initie l'induction ou la répression de gènes impliqués dans l'angiogenèse, la glycolyse, l'érythropoïèse, la respiration, la vasodilatation et l'apoptose. (Brahimi-Horn and Pouyssegur 2006)

Function	Genes
Cell proliferation	Cyclin G2, IGF2, IGF-BP1, IGF-BP-2, IGF-BP-3, WAF-1, TGF- α , TGF- β 3
Cell survival	ADM, EPO, IGF2, IGF-BP1, IGF-BP-2, IGF-BP-3, NOS2, TGF- α , VEGF
Apoptosis	NIP3, NIX, RTP801
Motility	ANF/GPI, c-MET, LRP1, TGF- α
Cytoskeletal structure	KRT14, KRT18, KRT19, VIM
Cell adhesion	MIC2
Erythropoiesis	EPO
Angiogenesis	EG-VEGF, ENG, LEP, LRP1, TGF- β 3, VEGF
Vascular tone	α_{1A} -adrenergic receptor, ADM, ET1, Haem oxygenase-1, NOS2
Transcriptional regulation	DEC1, DEC2, ETS-1, NUR77
pH regulation	Carbonic anhydrase 9
Regulation of HIF-1 activity	P35srj
Epithelial homeostasis	Intestinal trefoil factor
Drug resistance	MDR1
Nucleotide metabolism	Adenylate kinase 3, Ecto-5'-nucleotidase
Iron metabolism	Ceruloplasmin, Transferrin, Transferrin receptor
Glucose metabolism	HK1, HK2, AMF/GPI, ENO1, GLUT1, GAPDH, LDHA, PFKFB3, PFKL, PGK1, PKM, TPI, ALDA, ALDC
Extracellular-matrix metabolism	CATHD, Collagen type V (α 1), FN1, MMP2, PAI1, Prolyl-4-hydroxylase α (1), UPAR
Energy metabolism	LEP
Amino-Acid metabolism	Transglutaminase 2

Figure 9 : Gènes activés de manière transcriptionnelle par HIF-1.

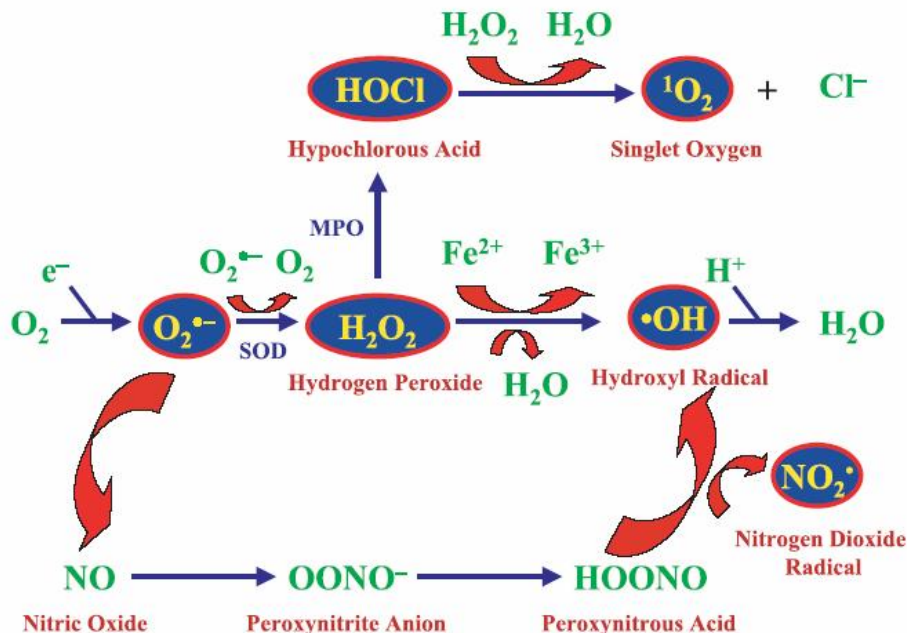


Figure 10 : Schéma représentant les différentes voies menant à la génération de ROS et de RNS.(Haddad 2004)

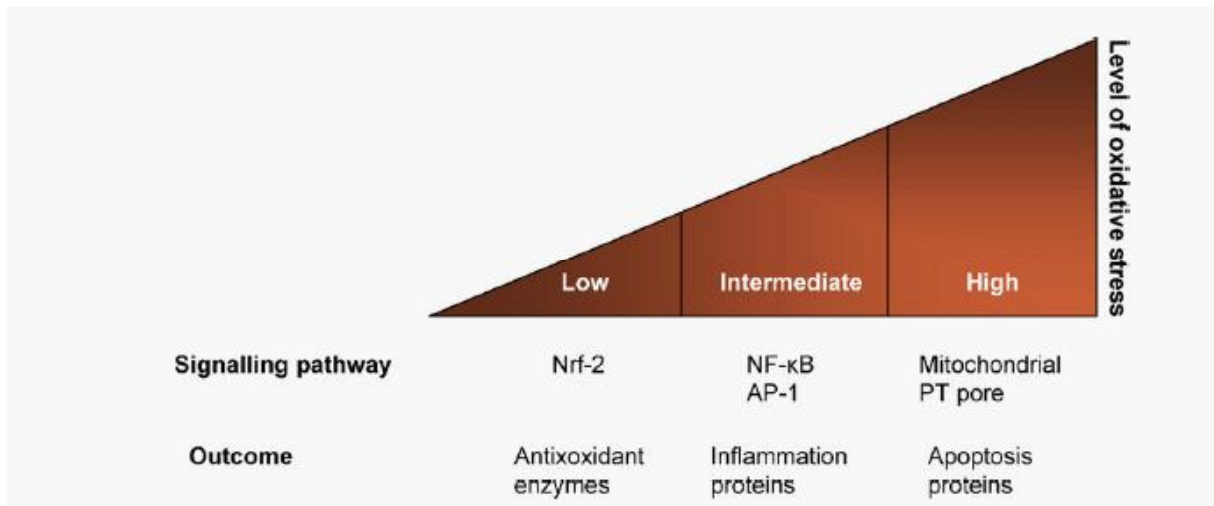


Figure 11: Un faible stress oxydatif induit Nrf2, un facteur de transcription qui a pour gènes cibles des enzymes antioxydantes. Une quantité intermédiaire de ROS entraîne l'activation du facteur de transcription NF-κB impliqué dans les réponses inflammatoires. Une quantité élevée de ROS induit une perturbation du pore de transition de perméabilité (pore PT) des mitochondries et une interruption du transfert des électrons. Un stress oxydatif élevé mène donc finalement à l'apoptose ou à la nécrose des cellules.

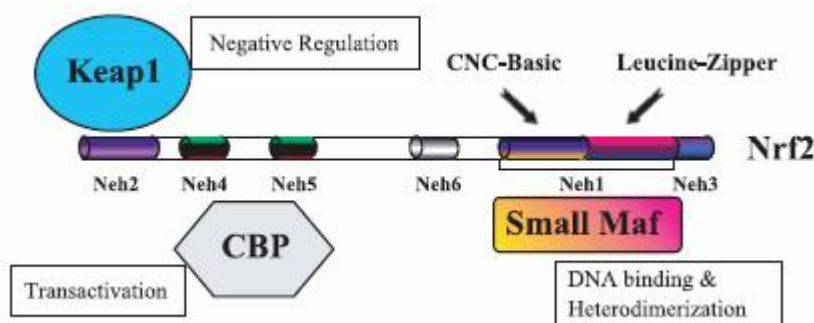


Figure 12: Structure de la protéine Nrf2

Nrf2 est constitué de 6 domaines conservés nommés de Neh1 à Neh6. Au niveau de son extrémité C-terminale, la protéine présente un domaine leucine zipper qui est nécessaire pour la dimérisation avec une petite protéine MAF. Keap 1 se lie à Nrf2 via le domaine Neh2. Les domaines Neh4 et Neh5 lient CBP pour activer la transcription. (Itoh, Tong et al. 2004)

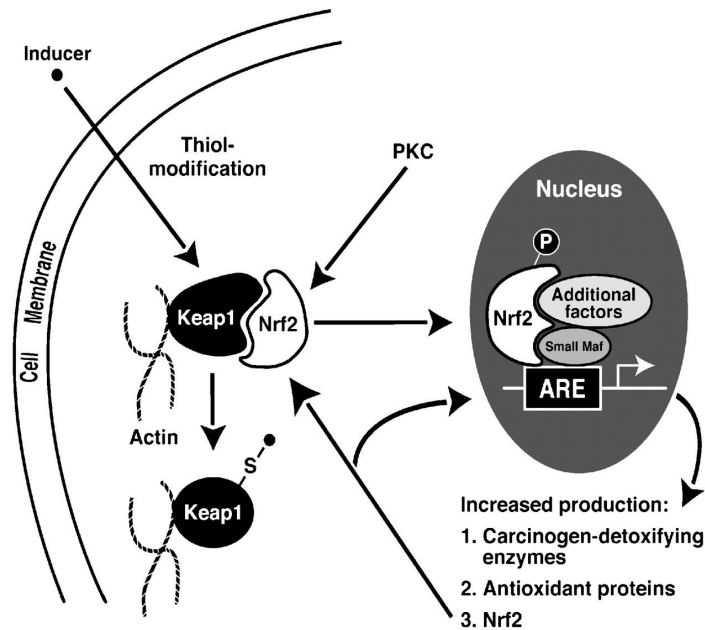


Figure 13 : Schéma simplifié représentant la voie d'activation de Nrf2.(Zhang and Gordon 2004)

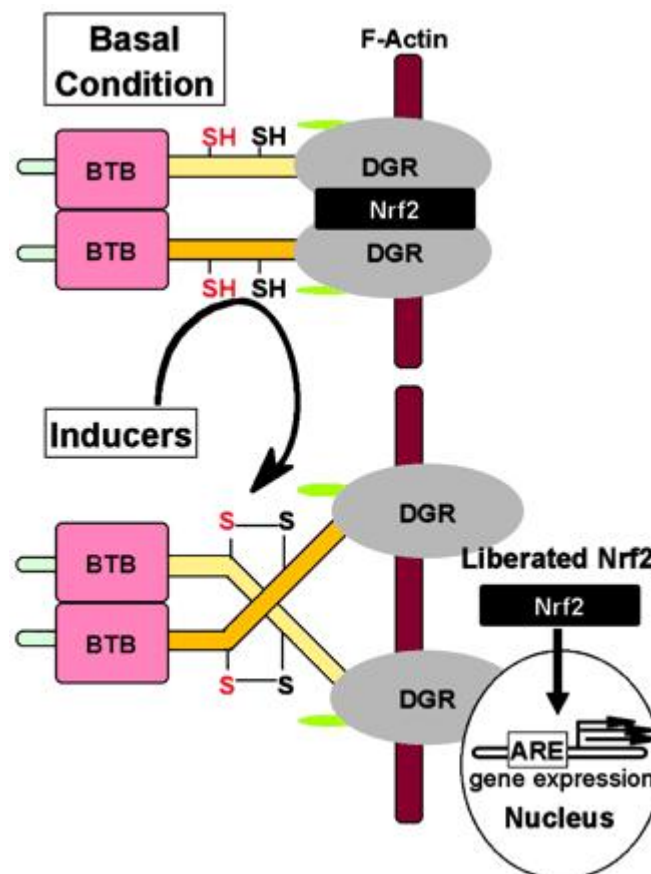


Figure 14 : Schéma soutenant l'hypothèse selon laquelle la libération de Nrf2 serait permise grâce à la modification par les oxydants de résidus cystéines de Keap1.(Wakabayashi, Dinkova-Kostova et al. 2004)

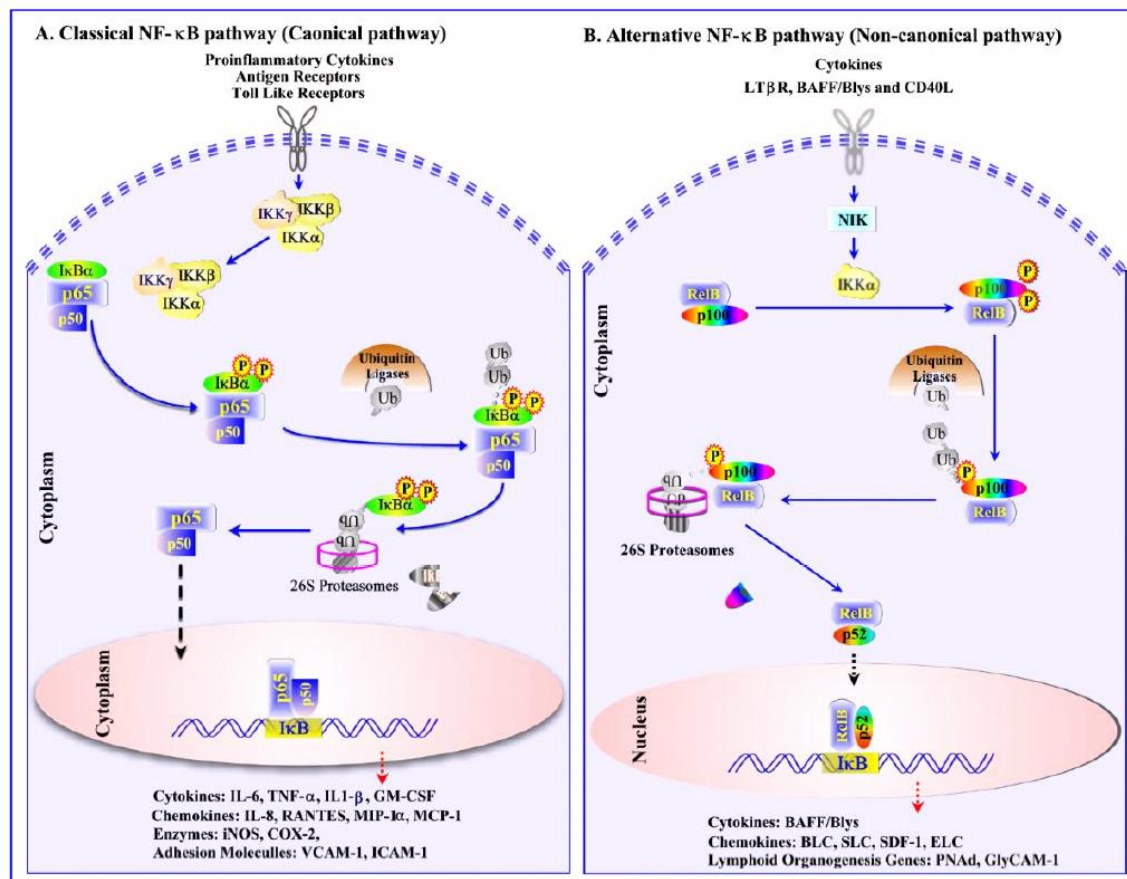


Figure 15 : Schéma représentant les deux voies d'activation différentes de NF-κB : la voie classique et la voie alternative.(Xiao 2004)

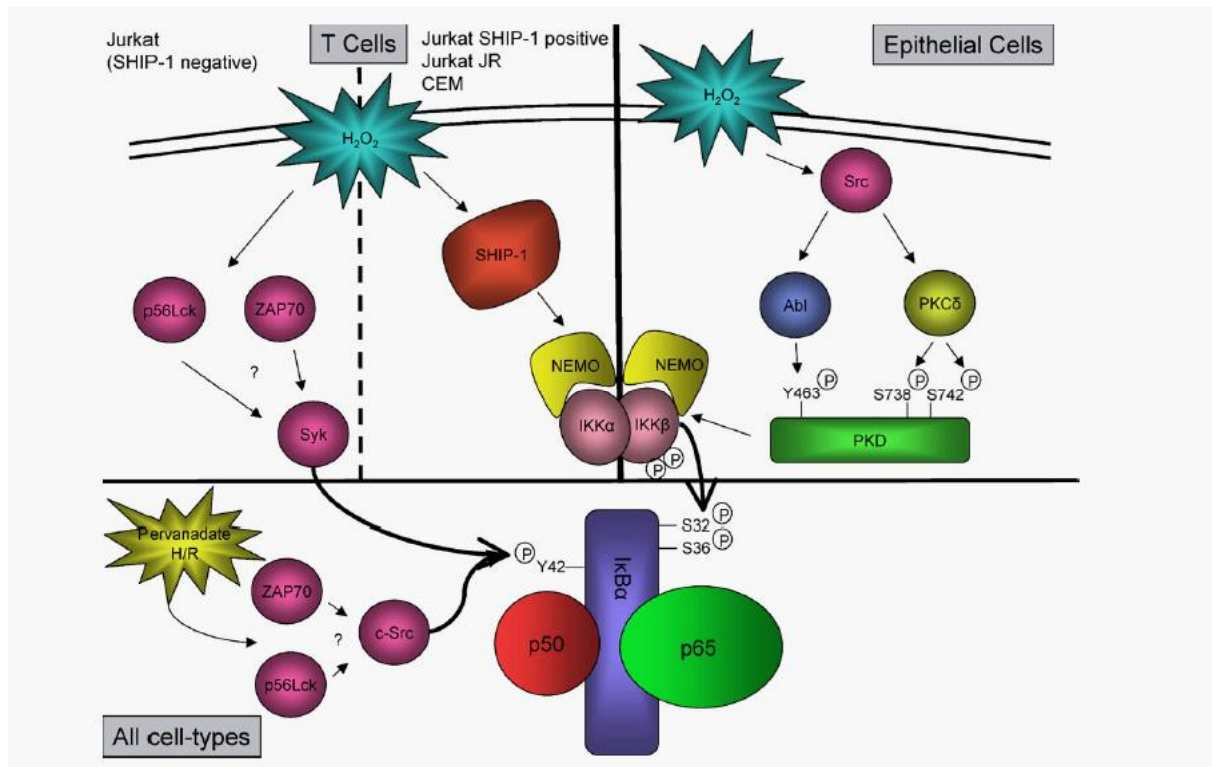


Figure 16: Mécanisme d'activation de NF-κB induit par le H₂O₂ dans les cellules T et dans les cellules épithéliales.

Matériel et méthodes

1. La culture cellulaire

La lignée cellulaire avec laquelle nous avons travaillé tout au long de ce mémoire est une lignée humaine appelée EAhy926. Cette lignée dérive de la fusion de cellules endothéliales de veines de cordon ombilical (HUVEC) avec des cellules de carcinome pulmonaire humain (A549) (Edgell, McDonald et al. 1983)

1.1. Matériel

- § PBS stérile (Biowhittacker, Belgique)
- § Trypsine-EDTA : solution de trypsine (0,5g/l) et d'EDTA (0,2g/l) (Gibco, UK)
- § Tube de 10 ml (Sterilin, UK)
- § Boîtes de culture de 75 cm² (T75) (Costar, Corning, USA)
- § Milieu de culture complet:
 - Ø Milieu DHG-L1 (4,5 g/l de D-glucose et pas de NaHCO₃) (Invitrogen)
 - Ø 10% de sérum de veau fœtal (Gibco)

1.2. Méthode

Tout d'abord, le milieu de culture est décanté et les cellules sont rincées deux fois avec 5 ml de PBS stérile. Une fois le PBS décanté, 1,5 ml de trypsine-EDTA est ajouté afin de détacher les cellules, et la boîte de culture T75 est placée à 37°C durant 4 minutes.

Ensuite, l'ajout de 5,5 ml de milieu de culture complet permet de stopper l'action de la trypsine. La suspension cellulaire est alors récupérée dans un tube de 10 ml et centrifugée pendant 7 minutes à 1000 rpm.

Une fois la centrifugation terminée, le surnageant est décanté et le culot est resuspendu dans du milieu de culture complet. La suspension cellulaire est alors répartie soit dans de nouvelles boîtes de culture T75 annotées, soit dans des boîtes 24 puits.

Un volume adéquat de milieu de culture complet est ajouté et les boîtes sont finalement placées dans une étuve à 37°C (5% CO₂, 95% air, 90% hygrométrie).

2. Incubation sous hypoxie

2.1. Matériel

- § Milieu CO₂ indépendant complet :
 - Ø Milieu CO₂- indépendant (Gibco, UK)
 - Ø L-Glutamine (Sigma, USA) (36 mg pour 500 ml de milieu)

2.2 Méthode

Avant de placer les cellules dans un environnement hypoxique, le milieu de culture est décanté et remplacé par du milieu CO₂-indépendant complet : 1 ml/puits pour les plaques 24 puits et 10 ml par T75.

Les boîtes sont ensuite ouvertes et placées dans un incubateur où l'atmosphère est composée de 99% d'azote et 1% d'oxygène. L'incubateur est placé à 37°C.

Lors de l'incubation en hypoxie intermittente, les cellules, après avoir subi une heure d'hypoxie, sont réoxygénées pendant 30 minutes. Une fois la réoxygénation terminée, les boîtes sont de nouveau incubées sous hypoxie pour une durée d'une heure. Ces cycles d'hypoxie-réoxygénation sont répétés 4 ou 5 fois suivant l'expérience.

Pour une incubation en hypoxie chronique, l'incubation se fait de la même manière mais les cellules restent sous hypoxie pendant la durée totale de l'incubation et ne subissent pas de réoxygénation. Ces cellules sont laissées dans l'incubateur pendant toute la durée de l'incubation, c'est-à-dire 6h ou 7h30 en fonction du nombre de cycles d'hypoxie intermittente que nous réalisons.

Finalement, d'autres boîtes sont incubées dans les mêmes conditions mais sont placées en normoxie dans un environnement où l'atmosphère est normale (20% O₂).

3. Test de viabilité

3.1. Principe

Ce test est réalisé à l'aide de deux colorants : le bromure d'éthidium et l'acridine orange. L'acridine orange permet de colorer les cellules vivantes en vert tandis que le bromure d'éthidium est un agent intercalant qui marque l'acide nucléique. Il colore les cellules mortes en orange. Lorsque les cellules sont vivantes, ce marqueur ne sait pas s'introduire dans les cellules et atteindre leur noyau. Le comptage des cellules mortes et vivantes est réalisé sous microscope à fluorescence.

3.2. Matériel

- § Bromure d'éthidium/ acridine orange
- § PBS (9g NaCl, 20 ml tampon phosphate 0,5M, eau distillée, pH 7,4 pour 1l)
- § Plaques 24 puits (Costar, Corning, USA)
- § Microscope à fluorescence

3.3. Méthode

Les cellules sont repiquées la veille à une densité de 50000 cellules/ puits. Le lendemain, le milieu est décanté et les cellules sont rincées deux fois au PBS. Une goutte de bromure d'éthidium/ acridine orange est déposée dans chaque puits. Finalement, les cellules sont observées et comptées à l'aide du microscope à fluorescence.

4. Immunofluorescence

4.1. Principe

Le marquage en immunofluorescence est une technique utilisée pour visualiser l'abondance et la localisation subcellulaire d'une protéine d'intérêt.

L'immunofluorescence nécessite l'utilisation de deux types d'anticorps. Un anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt est tout d'abord utilisé. Ensuite, un anticorps secondaire est introduit. Ce dernier est capable de reconnaître l'anticorps primaire et est couplé à un fluorochrome. Le fluorochrome possède la propriété d'absorber l'énergie lumineuse et de la restituer rapidement sous forme de lumière fluorescente, visualisable à l'aide d'un microscope confocal.

4.2. Matériel

- § Plaques 24 puits (Costar, Corning, USA)

- § Lamelles couvre-objets de 13mm de diamètre (Vel, Allemagne)
- § Lames porte-objets de 2,6 x 7,6 cm (Vel, Allemagne)
- § PBS : (pour 1 litre)
 - 9 g NaCl (Merck, Allemagne)
 - 20 ml de tampon phosphate 0,5M PH 7,4
 - Porter au volume d'un litre avec de l'eau distillée
- § PBS + BSA : Dissoudre 2 g de BSA (Sigma, USA) dans 100ml de PBS
- § PBS + Triton X-100 1% (T-9284, Sigma,USA)
- § PBS + PFA 4% (Merck, Allemagne)
- § Anticorps primaires
- § Anticorps secondaires
- § Topro-3 (Molecular Probe, USA)
- § Mowiol (Sigma-Aldrich, Allemagne-UK) pour le montage des lamelles sur les lames
- § Microscope confocal (Leica, Allemagne)

4.3. Méthode

Les cellules EAhy926 sontensemencées à une densité de 35000 cellules par puits sur des lames couvre-objets stérilisées à l'alcool et déposées dans chaque puits.

Le surlendemain, les cellules subissent 4 cycles d'hypoxie intermittente pendant une durée totale de 6h ou sont incubées en hypoxie chronique ou en normoxie pendant 6h.

Une fois les incubations terminées, les puits sont décantés et les lames sont directement fixées avec 300µl de PBS-PFA 4% pendant 10 minutes. Pour ce qui est des hypoxies intermittentes, les cellules sont fixées après chaque étape de la cinétique. Les cellules sont ensuite rincées trois fois durant 5 minutes avec du PBS et placées toute la nuit à 4°C.

Le jour suivant, les cellules sont perméabilisées avec 500µl de PBS-Triton 1% et subissent ensuite de nouveau trois rinçages successifs au PBS-BSA 2%.

La chambre humide d'incubation est alors préparée en y déposant un papier Whatman humidifié, recouvert d'un parafilm. Une goutte de 30µl d'anticorps primaire dilué dans du PBS-BSA 2% est déposée sur le parafilm (Tableau 1). Chaque couvre-objet est alors récupéré au fond des puits et retourné sur la goutte d'anticorps primaire pendant 2h à RT. Les lamelles sont ensuite replacées dans les plaques 24 puits pour y subir 3 rinçages au PBS-BSA 2%.

Une fois les rinçages terminés, les cellules sont mises en présence de l'anticorps secondaire dilué dans du PBS-BSA durant 1h à température ambiante et à l'obscurité afin de préserver le fluorochrome (Tableau 1).

Les cellules sont ensuite encore rincées 3 fois avec du PBS-BSA et une fois avec du PBS seul. Finalement, un marquage des noyaux est effectué. Pour ce faire, 30µl de TOPRO-3 dilué 80x dans de la RNase sont déposés sur le parafilm et les lamelles sont retournées sur cette goutte pendant 30 minutes à l'abri de la lumière.

Trois derniers rinçages sont alors effectués dans du PBS avant que les lamelles ne soient montées sur les lames porte-objets à l'aide de Mowiol préchauffé à 57°C. Les lames sont alors conservées à 4°C et pourront par la suite être observées au microscope confocal en gardant le photomultiplicateur constant.

5. Western Blot

5.1. Principe

Le Western Blot est une méthode permettant de détecter une protéine spécifique dans un extrait cellulaire. Cette méthode permet ainsi de mettre en évidence des variations de l'expression d'une protéine en fonction de différentes conditions testées.

Cette technique utilise l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide pour séparer les protéines selon leur masse. L'électrophorèse consiste en la migration de particules chargées placées sous l'influence d'un champ électrique. Les protéines étant toutes chargées négativement, la migration ne se fera donc qu'en fonction de la masse moléculaire de chaque protéine.

Une fois l'électrophorèse terminée, les protéines sont transférées sur une membrane. La protéine d'intérêt est ensuite détectée grâce à un anticorps primaire dirigé spécifiquement contre cette protéine.

Finalement, le dépôt d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase, capable de reconnaître le fragment Fc des anticorps primaires, permet la détection. La révélation se fait à l'aide de luminol qui est un substrat de la peroxydase. Ce dernier est oxydé en présence de peroxydase, ce qui produit de la lumière qui est détectée grâce à un film radiographique.

5.2. Matériel

Pour l'extraction par centrifugation différentielle

- § PBS (9g NaCl, 20ml Tampon phosphate 0,5M, eau distillée, pH 7,4 pour 1l)
- § Saccharose 0,25M
- § Racloirs
- § Dounce avec piston B
- § Tubes de 15 ml tarés
- § Tubes rigides

Pour le dosage des protéines par la méthode de Bradford

- § Colorant Bio-Rad protein Assay 5x (Bio-Rad, USA)
- § Etalon BSA (Bovine Serum Albumin) (2µg/µl)

Pour le Western Blot (Tableau 2)

- § Bleu de charge concentré 5x
- § Gel séparateur d'acrylamide
- § Gel concentrateur
- § Tampon d'électrophorèse
- § Cuve d'électrophorèse
- § Etalon de poids moléculaire Seeblue plus 2 (Invitrogen, USA)
- § Générateur (Bio-Rad Power PAC 300)
- § Papier Whatman (Merck, Allemagne)
- § Membrane PVDF (Amersham, UK)
- § Tampon de transfert
- § Appareil de transfert (Amersham Bioscience, USA)
- § Tampon de rinçage
- § Anticorps primaires et secondaires
- § Agent bloquant (Poudre de lait dégraissé, CDK105, Amersham, UK)
- § Substrat de révélation ECL Advance Western Blotting Detection Kit (Amersham, USA)
- § Film radiographique (Amersham, USA)
- § Solution de révélation (Ilford 2000RT Imaging, USA)
- § Solution de fixation (Ilford 2000RT Imaging, USA)

5.3. Méthode

5.3.1. Extraction par centrifugation différentielle

Cette extraction a été réalisée afin d'obtenir des extraits nucléaires et des extraits cytosoliques à partir des mêmes cellules. Il est nécessaire de signaler que l'entièreté de l'extraction a été réalisée sur glace.

Une fois les différentes incubations terminées, le milieu de culture présent dans les boîtes T75 est décanté et les cellules sont rincées successivement trois fois avec 10ml de PBS puis deux fois avec 10 ml de saccharose.

Le tapis cellulaire est ensuite raclé dans 800µl de saccharose et le lysat cellulaire récupéré est transféré dans un dounce. La boîte de culture fut ensuite rincée de nouveau avec 1,2 ml de saccharose afin de récupérer le maximum de cellules et le lysat fut ajouté aux 800µl déjà présents dans le dounce.

Ensuite, 6 passages au dounce sont réalisés et le contenu du dounce est transféré dans un tube taré de 15ml.

Ce tube subit alors une centrifugation à 4°C pendant 10 minutes à 1700 rpm. Une fois la centrifugation terminée, le surnageant est récupéré en laissant environ 500µl au dessus du culot et est transféré dans un nouveau tube taré rigide que l'on nomme PNS.

Le culot quant à lui est resuspendu dans 1 ml de saccharose et cette suspension est transférée dans le dounce. Le tube de 15 ml est rincé avec du saccharose pour avoir un volume final de 2 ml dans le dounce. Six passages consécutifs avec le dounce sont effectués. Le contenu du dounce est transféré dans un tube taré de 15 ml qui est ensuite centrifugé à 1500 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant est ensuite récupéré en laissant 300µl au dessus du culot et est ajouté au surnageant déjà récupéré précédemment et transféré dans un tube rigide nommé PNS. Le culot est homogénéisé et transféré dans un dounce pour y subir 6 passages consécutifs. Le contenu du dounce est transféré dans un eppendorf et représente la fraction nucléaire.

Le tube rigide nommé PNS est quant à lui centrifugé à 35000 rpm, le temps de centrifugation dépendant du volume présent dans le tube (temps référé dans une table).

Une fois la centrifugation terminée, le surnageant est récupéré. Ce surnageant représente la fraction cytosolique.

Le culot correspond à la fraction MLP (Mitochondries, Lysosomes, Peroxysomes). Ce dernier est resuspendu à l'aide d'une baguette en verre dans du saccharose et transféré dans un eppendorf.

Tous les extraits furent finalement conservés à -70°C.

5.3.2. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Ce dosage permet de déterminer la quantité de protéines présente dans chacun des échantillons afin de déterminer le volume à prélever dans chaque échantillon pour charger sur le gel la même quantité de protéines dans chaque puits.

Pour ce faire, 1ml de colorant Bradford dilué 5x et filtré est placé dans des tubes. A ce ml sont ajoutés toutes les 30 secondes 15 µl d'extraits protéiques. 5 minutes après l'ajout de l'extrait, une mesure de la densité optique est réalisée à une longueur d'onde de 595nm à l'aide du spectrophotomètre. L'appareil est mis à zéro avec de l'eau distillée et le dosage de chaque échantillon est réalisé en double.

Certains contrôles qui permettront de normaliser les valeurs doivent également être réalisés. Il s'agit du tampon de lyse qui servira de blanc pour les échantillons, de la BSA qui servira d'étalon et d'eau distillée qui servira de blanc pour l'étalon.

Finalement, la concentration en protéines de chaque échantillon peut-être calculée grâce à la formule suivante :

$$\mu\text{g} / \mu\text{l} = \frac{(\text{moyenne DO}_{\text{échantillon}} - \text{moyenne DO}_{\text{blanc échantillon}}) / (\text{moyenne DO}_{\text{étalon}} - \text{moyenne DO}_{\text{eau}}) \times 5}{\text{Volume d'échantillon}}$$

5.3.3. Préparation des échantillons

Le volume maximum qui peut être déposé dans les puits d'un grand gel est de 63 μl . Un volume d'échantillon correspondant à 10 μg de protéines est prélevé et déposé dans un eppendorf. Y sont ajoutés 12,5 μl de bleu de charge qui sera ainsi au final dilué 5X. Ces échantillons sont portés au volume final de 63 μl avec de l'eau distillée. Finalement, les échantillons sont chauffés à 100 °C pendant 5 minutes afin de dénaturer les protéines. Ils sont ensuite brièvement centrifugés et chargés sur le gel.

5.3.4. Electrophorèse

Au départ, le montage des plaques est réalisé à l'aide de spacers et de pinces. Une fois le montage terminé, les gels peuvent être coulés. Tout d'abord, le gel séparateur est coulé en s'arrêtant environ 1 cm en dessous du peigne. 1 ml d'isobutanol est alors déposé à la surface du gel afin d'empêcher la présence d'O₂ et de permettre la polymérisation du gel. Lorsque le gel est polymérisé (environ 1h), l'isobutanol est rincé avec de l'eau et le surplus d'eau est éliminé à l'aide d'un papier whatman. Le gel concentrateur est préparé et coulé. Le peigne est placé entre les deux plaques. Il formera dans le gel les puits de chargement. Ensuite, lorsque la polymérisation est finie, les pinces, le peigne et les spacers peuvent être retirés. Le gel est alors placé dans la cuve en prenant soin de mettre la petite plaque vers l'intérieur de la cuve. Du running buffer est ajouté dans le compartiment supérieur ainsi que dans le compartiment inférieur de la cuve. Il faut s'assurer à l'aide d'une petite seringue qu'il n'y a pas de bulles qui pourraient gêner le passage du courant. Les puits de chargement sont remplis avec du running buffer. Les échantillons ainsi que l'étalon de poids moléculaire peuvent dès lors être chargés dans les puits. La cuve est enfin branchée et réglée sur 35mA durant 1heure. Lorsque les bandes ont dépassé le gel concentrateur, la migration au sein du gel séparateur s'effectue à 45mA pendant 2h environ.

5.3.5. Transfert

Une membrane et deux papiers whatman de la même taille que le gel sont découpés. La membrane est ensuite réhydratée pendant 1 minute dans du méthanol, puis déposée pendant 10 minutes dans du blotting buffer. Pendant ce temps, le gel est démoulé, la partie supérieure du gel correspondant au gel concentrateur est éliminée. La membrane est déposée sur le gel. Ensuite, de part et d'autre sont déposés des papiers whatman humidifiés dans du blotting buffer. Des éponges viennent finalement recouvrir les papiers whatman. Il faut s'assurer qu'il n'y a pas de bulles d'air entre chaque couche du système sandwich (Figure 1).

Le système sandwich est finalement placé dans l'appareil de transfert. Afin de permettre la migration des protéines sur la membrane, un courant de 35mA est appliqué toute la nuit.

5.3.6. Blocking et révélation

Une fois le transfert terminé, la membrane est bloquée dans du TBS-T contenant 2% de lait Amersham pendant 1 heure. Ce traitement va permettre une meilleure spécificité de l'anticorps car les protéines du lait vont occuper les sites de fixation aspécifique de l'anticorps. S'ensuit une incubation de 2 heures de la membrane avec l'anticorps primaire (tableau 3) dilué dans du TBS-T contenant du lait Amersham. La membrane est ensuite rincée trois fois dans du TBS-T. Après cela, l'anticorps secondaire dilué de nouveau dans du TBS-T contenant du lait Amersham est ajouté et l'incubation dure 45 minutes. La membrane est ensuite rincée 3 fois et finalement révélée. Pour ce faire, la membrane est recouverte avec 3 ml de solution ECL (Enhanced Chemo Luminescent) pendant 5 minutes. La révélation se fait en chambre noire en déposant un film radiographique sur la membrane pendant une durée dépendant de la protéine que l'on révèle. Le film est ensuite déposé successivement dans une solution de révélation, dans de l'eau puis dans une solution de fixation et enfin rincé abondamment.

6. Les microdamiers à ADN

6.1. Principe

Le microdamier est un damier microscopique sur lequel sont fixées des séquences d'acides nucléiques simple brin. Chaque séquence du damier est unique et spécifique d'un seul gène. Les séquences génétiques à analyser, issues d'un échantillon biologique, sont marquées et déposées sur le microdamier. Après l'hybridation et après des étapes de lavage, le damier est scanné à l'aide d'un laser et une image informatique de celui-ci est obtenue.

Nous avons utilisé le microdamier "Dualchip human inflammation". Ce damier est conçu pour réaliser des analyses d'expression de gènes impliqués dans l'inflammation. Il contient des sondes de capture pour 310 gènes, spottées en triplicats.

Cette méthode nécessite différentes étapes. Tout d'abord, les cellules sont incubées dans différentes conditions et l'ARN total est extrait de ces cellules. Ensuite, l'ARNm est rétrotranscrit en ADNc. Il s'agit d'une rétrotranscription un peu particulière qui inclut l'incorporation de nucléotides biotinylés. Finalement, après avoir hybridé les ADNc sur le microdamier et obtenu l'image informatique, les ADNc sont quantifiés.

6.2. Matériel

Pour l'extraction d'ARN total:

- § RNagents Total RNA Isolation System (Promega, USA)
- § Phénol/chloroforme/Isoamyl alcool (Promega, USA)
- § Ethanol (Merck, Allemagne)
- § Nuclease free water (Promega, USA)

Pour la reverse transcription:

- § RNasin Ribonuclease inhibitor
- § Ribonucléase H
- § RNase-free water (Promega, USA)
- § Oligo-dt (Gibco, UK)
- § Mix dNTP

- § Internal Standard mix
- § Buffer RT 5x (Invitrogen, USA)
- § Superscript II (Invitrogen, USA)

Pour l'hybridation :

- § Dualchip human inflammation (Eppendorf, EAT)

6.3. Méthode

6.3.1. Extraction d'ARN

Cette manipulation doit être impérativement réalisée dans un environnement "RNase free" afin d'empêcher toute dégradation de l'ARN. Pour ce faire, la paillasse ainsi que tout le matériel utilisé doivent être nettoyés au SDS 1%.

Suite aux différentes incubations, les boîtes de culture sont décantées sur glace à l'aide de la pompe à vide et le tapis cellulaire est raclé dans 600 µl de tampon de dénaturation à 4°C. Le lysat cellulaire est ensuite transféré dans un eppendorf et conservé toute la nuit à -70°C. Le lendemain, 60 µl d'acétate de sodium 2M sont ajoutés, ce qui va permettre la précipitation des protéines. Dans chaque eppendorf sont ensuite ajoutés 600 µl de chloroforme/Phénol/Isoamyl alcool et les échantillons sont vortexés jusqu'à l'obtention d'une solution blanchâtre et homogène.

Les échantillons sont alors maintenus sur glace pendant 15 minutes puis centrifugés à 10000 g à 4°C durant 15 minutes. Pendant ce temps, de nouveaux eppendorfs sont annotés.

Une fois la centrifugation terminée, la phase supérieure contenant l'ARN est récupérée et transférée dans les nouveaux eppendorfs. Un volume d'isopropanol égal au volume de la phase aqueuse récupérée est ajouté dans chaque eppendorf. Suite à cela, les échantillons sont placés à -20°C pendant 45 minutes afin de permettre la précipitation de l'ARN puis centrifugés à 4°C à 13000 g pendant 10 minutes. Le surnageant est alors décanté et le culot est quant à lui resuspendu dans 1 ml d'éthanol 75%.

A lieu alors une nouvelle centrifugation à 13000 g durant 10 minutes. Le surnageant obtenu est de nouveau décanté et le culot d'ARN est séché à l'aide du speedvaquer. Finalement, le culot est resuspendu dans 25 µl d'eau RNase free.

Afin de permettre un dosage au spectrophotomètre, 2µl de cette solution sont prélevés et à ceux-ci sont ajoutés 198µl d'eau RNase free. L'absorbance est mesurée à 260 et à 280 nm.

6.3.2. Reverse transcription

Cette méthode permet de générer de l'ADN à partir d'ARN total grâce à l'utilisation d'amorces poly-T.

2 µg d'ARN total porté à un volume final de 4,5 µl avec de l'eau RNase free sont mélangés avec 2 µl de standard interne et 2 µl d'amorce oligo-dT. Ce mélange est ensuite incubé 10 minutes à 70°C ce qui permet une dénaturation. Il est ensuite centrifugé légèrement et placé 5 minutes sur glace pour empêcher la renaturation. Durant ces 5 minutes, le mélange réactionnel est préparé et 9 µl de ce mélange sont ajoutés dans chaque eppendorf (Tableau 4). Il s'ensuit une incubation de 5 minutes à température ambiante. 1,5 µl de superscript RII est alors ajouté à chaque échantillon et ces derniers sont placés pendant 1h30 à 42°C. Cette étape est ensuite répétée une deuxième fois. Au terme de l'incubation à 42°C, les eppendorfs sont centrifugés et incubés à 70°C pendant 15 minutes. Afin de dégrader l'ARN, 1 µl de RNase H est ajouté. Finalement, l'ADNc est placé successivement à 37°C pendant 20 minutes puis à 95°C pendant 3 minutes. Chaque eppendorf est alors centrifugé brièvement et conservé à -20°C.

6.3.3. Hybridation

L'ADN obtenu suite à la reverse transcription est ensuite hybridé sur les microdamiers en suivant les étapes indiquées dans le manuel d'instruction Dualchip. Une fois l'ADN injecté dans les microdamiers, les lames sont placées sur un Thermoblock à 60°C pendant 16h pour permettre à la réaction d'hybridation de se faire. Le lendemain, les lames sont retirées du Thermoblock et rincées deux fois pendant 2 minutes. Ensuite, l'adhésif est détaché et les lames sont à nouveau rincées deux fois. Les lames sont ensuite retournées sur une goutte de 800 µl d'anticorps conjugué à la cyanine 3 et incubées durant 45 minutes. Au terme des 45 minutes, surviennent plusieurs rinçages successifs. Les lames sont ensuite scannées à l'aide d'un scanner laser confocal et les spots détectés sont quantifiés à l'aide du programme Imagegene.

7. RT PCR en temps réel

7.1. Principe

La PCR en temps réel est une PCR quantitative qui mesure la quantité d'ADNc dans un échantillon, la quantité d'ADNc étant directement proportionnelle à la quantité d'ARNm. Cette technique est couramment utilisée pour quantifier l'expression d'un gène. Cette technique peut donc être employée pour comparer des échantillons soumis à différentes conditions permettant ainsi d'évaluer les variations d'expression qui se produisent.

Cette technique est basée sur la quantification de l'émission de fluorescence par le SyBr Green, un agent intercalant qui ne se lie qu'à l'ADN double-brin. La fluorescence émise permet donc de mesurer la quantité d'ADN double brin produite au cours de la réaction.

La quantification repose sur la notion de cycle seuil ou Ct. Le cycle threshold représente le cycle PCR à partir duquel la fluorescence émise se distingue du bruit de fond. Plus le Ct est faible, et plus il y avait de matériel au départ. Le Ct est donc inversement proportionnel à la quantité d'ADN de départ.

7.2. Matériel

Pour l'extraction d'ARN total (Voir 5.2)

Pour la reverse transcription

- § RNAsin Ribonuclease inhibitor (Promega, USA)
- § Ribonucléase H (Gibco, UK)
- § RNase-free water (Promega, USA)
- § dNTP mix (Eurogentec, Belgique)
- § Superscript II (Invitrogen, USA)
- § Buffer RT 5x (Invitrogen, USA)
- § Oligo-dT (Gibco, UK)

Pour la real-time PCR

- § RNase-free water (Promega, USA)
- § Amorces sens et anti-sens (Applied Biosystems, Pays-Bas) (Tableau 5)
- § Master mix Sybr Green PCR (Applied Biosystems, Pays-Bas)
- § 96-well optical reaction plate (Applied Biosystems, Pays-Bas)
- § Optical Adhesive Covers (Applied Biosystems Pays-Bas)
- § 7000 sequence detection system (Applied Biosystems, Pays-Bas)

7.3. Méthode

7.3.1. Extraction d'ARN (voir point 6.3.1)

7.3.2. Reverse transcription

Tout d'abord, 2 µl d'extraits d'ARN total sont dilués 10x dans de l'eau RNase free afin de pouvoir prendre par la suite une quantité d'extrait suffisamment grande pour qu'il n'y ait pas d'erreur de pipettage. De ces 20 µl est prélevé un volume correspondant à 2 µg d'ARN total qui est placé dans un nouvel eppendorf. Y sont ajoutés 2 µl d'oligo-dT ainsi que de l'eau RNase free pour obtenir un volume total de 9,5 µl. Les eppendorfs sont ensuite placés 10 minutes à 70°C puis 5 minutes sur glace. 9 µl du mélange réactionnel sont alors ajoutés à chaque échantillon suivi d'une incubation de 5 minutes à RT (Tableau 6). Il s'ensuit l'ajout de 1,5 µl de Superscript RII. Les eppendorfs sont alors incubés pendant 1h30 à 42°C pour permettre une activité optimale de la Superscript. Afin de dénaturer la Superscript, une incubation de 15 minutes à 70°C est réalisée.

Finalement, 1 µl de ribonucléase H qui dégrade l'ARN est ajouté à chaque eppendorf et ces derniers sont placés à 37°C pendant 20 minutes. L'ADNc obtenu est conservé à -20°C.

7.3.3. Real-Time PCR

Pour chacun des gènes étudiés, un mix contenant 2,5 µl d'eau distillée, 5 µl d'amorce (1/3 de l'amorce sens, 1/3 de l'amorce anti-sens et 1/3 d'eau distillée) et 12,5 µl de Sybr Green est préparé. 20 µl de ce mix sont placés dans les puits d'une plaque 96 puits. A ces 20 µl sont ajoutés 5 µl d'ADNc dilué 100x dans de l'eau RNase free. Certains puits serviront de contrôles négatifs. Dans ces puits, l'ADN dilué sera remplacé par 5 µl d'eau distillée.

Une fois tous les puits remplis, la plaque est recouverte d'un film adhésif et centrifugée pendant 1 minute à 1000 rpm.

La plaque est finalement placée dans l'appareil. Le programme PCR se déroule en plusieurs étapes successives.

Une première étape de deux minutes à 50°C est suivie d'une dénaturation de 10 minutes à 95°C. Les 40 cycles d'amplification sont ensuite réalisés. La fluorescence associée à chaque puits est mesurée tout au long de cette amplification.

Les valeurs obtenues pour chaque gène sont normalisées par rapport à la tubuline. Pour ce faire, il faut soustraire de la moyenne des valeurs obtenues pour un même gène et une même condition la moyenne des valeurs de la tubuline obtenues pour cette même condition. Ensuite, il faut normaliser ce delta Ct obtenu par rapport à la normoxie correspondante ce qui donne un $\delta\delta Ct$. Finalement, pour obtenir le fold d'induction, il faut linéariser la fonction logarithmique. Pour ce faire, il faut calculer $2^{-\delta\delta Ct}$ (Tableau 7).

8. Mesure de l'activité de liaison à l'ADN de facteurs de transcription (Trans-AM)

8.1. Principe

Cette méthode permet de quantifier la liaison d'un facteur de transcription d'intérêt à sa séquence consensus sur l'ADN. Pour ce faire, des plaques 96 puits sont coatées avec des ADN trappeurs fixés au fond des puits. Ces trappeurs possèdent la séquence consensus reconnue par le facteur de transcription d'intérêt. Le dépôt dans ces puits d'extraits protéiques nucléaires permet la liaison du facteur de transcription à sa séquence consensus. Le facteur de transcription lié à l'ADN est ensuite détecté grâce à un anticorps primaire qui reconnaît un épitope du facteur de transcription et un anticorps secondaire couplé à une peroxydase.

8.2. Matériel

Pour l'extraction nucléaire (Tableau 8)

- § Na₂MoO₄ (Sigma, USA)
- § NaF (Merck, Allemagne)
- § PIC (Roche, Allemagne)
- § PIB (Roche, Allemagne)
- § HB1X
- § SA
- § RE
- § Tampon de lyse 0,5% NP-40

Pour le dosage (Tableau 9)

- § Plaques 96 puits coatées
- § Tampon de binding
- § Tampon de lyse
- § Pipette multichannel avec tips Biohit (Finlande)
- § Anticorps primaire
- § Anticorps secondaire
- § PBS50
- § Gloria
- § Tetra Methyl Benzide (Biosource, Belgique)
- § Solution Stop (Biosource, Belgique)
- § Spectrophotomètre (Ultramark, microplate Imaging System, Biorad, Germany)

8.3. Méthode

8.3.1. Extraction nucléaire

Une fois les incubations cellulaires terminées, le milieu de culture est décanté et les cellules sont rincées dans 10 ml de PBS auquel on a ajouté du NaF 5mM et du Na₂MoO₄ 1mM. Afin de faire gonfler les cellules, 10 ml de HB 1x sont ajoutés et incubés sur glace pendant 3 minutes. Une fois ce temps écoulé, le tampon hypotonique est décanté et les cellules sont raclées dans 500µl de tampon de lyse. Le lysat cellulaire est transféré dans un eppendorf et centrifugé pendant 30 secondes à 13000 rpm. Après cette centrifugation, le surnageant est décanté tandis que le culot contenant les noyaux est resuspendu dans 50µl de RE complet, puis dans 50 µl de SA complet. Les eppendorfs sont ensuite placés sur une roue à 4°C afin d'extraire les protéines nucléaires. Au terme des 30 minutes d'incubation, les échantillons sont centrifugés à 4°C pendant 10 minutes à 13000 rpm. Finalement, le surnageant contenant les protéines nucléaires est récupéré, aliquoté et conservé à -70°C. Un aliquot est utilisé pour le dosage de protéines par la méthode de Bradford.

8.3.2. Dosage de l'activité de liaison du facteur de transcription à l'ADN

Tout d'abord, 40 µl de tampon de binding sont placés dans chaque puits. 20 µl d'extraits protéiques dilués dans du tampon de lyse de façon à avoir 10 µg de protéines dans ces 20 µl y sont ajoutés. Chaque condition est réalisée en triplicats. Des contrôles négatifs sont également réalisés en remplaçant l'extrait protéique par du tampon de lyse. La plaque 96 puits est placée durant une heure sous légère agitation afin de faciliter la liaison du facteur de transcription à sa séquence consensus. Les puits sont ensuite rincés trois fois avec 200 µl de solution de lavage. Après cela, 100 µl d'anticorps primaire dilué dans du PBS50 + gloria sont déposés dans chaque puit. L'incubation dure 1 heure à température ambiante. Une fois l'incubation

terminée, les puits sont de nouveau lavés trois fois avec 200 µl de solution de lavage avant de déposer l'anticorps secondaire dilué. Après une heure d'incubation, les puits sont rincés 4 fois avec de la solution de lavage. La révélation peut alors débuter. Pour ce faire, 100 µl de TMB sont ajoutés dans chaque puits et la plaque 96 puits est placée à l'abri de la lumière pendant 10 minutes. Une fois ce temps écoulé, 100 µl de solution stop sont placés dans chaque puits pour arrêter la réaction. Le spectrophotomètre permet finalement une mesure de la DO à 450 nm avec la référence à 655 nm.

9. Les cartes microfluidiques

9.1. Principe

Cette méthode permet d'étudier des variations d'expression de gènes. Elle consiste en deux étapes. Dans une première étape, l'ADNc est rétrotranscrit à partir d'ARNm. Dans une seconde étape, des produits PCR sont synthétisés à partir des échantillons d'ADNc en utilisant le Taqman universal PCR master mix.

Ces cartes permettent de réaliser des centaines de réactions de PCR en temps réel simultanément. 1 à 8 échantillons peuvent être analysés en parallèle. Ces cartes peuvent détecter de 12 à 380 gènes.

9.2. Matériel

Pour reverse transcription

- § High Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystem, USA)
- § RNase free Water (Promega, USA)

Pour cartes microfluidiques

- § Taqman low density custom arrays (Applied Biosystem, USA)
- § Taqman universal PCR master mix (Roche, USA)
- § RNase free water (Promega, USA)

9.3. Méthode

9.3.1. Extraction d'ARN total (voir point 5.3.1)

9.3.2. Réverse transcription

Tout d'abord, 2 µl d'ARN total sont prélevés et dilués dans de l'eau RNase free de façon à obtenir une concentration finale de 2µg/10µl.

Ensuite un mélange contenant 2µl de RT Buffer 10x, 0,8 µl de dNTP Mix 25x, 2 µl de RT Random Primer, 14 µl de reverse transcriptase, 14 µl d'inhibiteurs de RNase et 3,2 µl d'eau RNase free est préparé. 10 µl de ce mélange sont ensuite placés dans un tube pour PCR.

10 µl de l'ARN dilué y sont ajoutés. Les tubes sont ensuite centrifugés légèrement et placés dans le thermo cycler. Ce dernier réalise différentes étapes à différentes températures (tableau 10). Finalement l'ADNc obtenu est conservé à -20°C.

9.3.3. Cartes microfluidiques

Au départ, l'ADNc doit être dilué 10x. Pour ce faire, 5 µl d'ADNc sont prélevés et 45 µl d'eau RNase free y sont ajoutés. 10 µl de cette dilution sont ensuite transférés dans un nouvel eppendorf. 40 µl d'eau RNase free ainsi que 50 µl de Taqman PCR master mix sont ensuite ajoutés dans cet eppendorf. Le mélange est vortexé doucement. L'échantillon est alors prêt à

être déposé dans la carte (figure 2). 100µl sont alors prélevés et injectés dans la carte en plaçant le tips dans le pore de gauche. Chaque condition est réalisée en double.

Une fois le remplissage de la carte terminé, celle-ci est centrifugée deux fois à 1200 rpm pendant une minute. La plaque est ensuite scellée. Finalement, l'extrémité supérieure contenant les puits de remplissage de la carte est découpée. La plaque peut alors être insérée dans l'appareil afin de débiter les réactions de PCR en temps réel.

10. Systèmes rapporteurs

10.1. Principe

Le système rapporteur permet de déterminer l'activité d'un facteur de transcription d'intérêt en fonction de différentes conditions étudiées. Pour ce faire, l'expression d'un gène rapporteur codant pour la luciférase Firefly est mesurée. Ce gène présente dans son promoteur une séquence consensus reconnue par le facteur de transcription d'intérêt. Si ce dernier est activé, il se lie à cette séquence consensus et permet la transcription d'un gène codant pour la luciférase.

La luciférase est une enzyme qui catalyse l'oxydation de la luciférine en oxyluciférine, en présence d'ATP et de magnésium. La luciférine en s'oxydant, émet de la lumière. Cette lumière est mesurée grâce à un luminomètre et est proportionnelle au taux de transcription du gène codant pour la luciférase, et donc à l'activité du facteur de transcription étudié.

Le plasmide encodant le système rapporteur est cotransfecté avec un plasmide de normalisation. Il s'agit d'un plasmide contenant le gène de la luciférase de Rénilla, une luciférase qui utilise un substrat différent de la luciférase Firefly. Son expression est sous la dépendance d'un promoteur constitutif. Il va permettre d'évaluer le rendement de la transfection ainsi que de standardiser les valeurs obtenues en fonction de l'efficacité de la transfection.

L'introduction de ces plasmides rapporteurs à l'intérieur des cellules est permise grâce au Superfect. Il s'agit d'un agent transfectant qui possède une charge positive et la capacité de déstabiliser les membranes. L'ADN étant chargé négativement, le Superfect va permettre la formation de complexes ADN/ Agent transfectant et faciliter l'entrée de ce complexe dans la cellule.

10.2. Matériel

- § Plasmide pRL (Rénilla luciférase)
- § Plasmide rapporteur (Tableau 11)
- § OptiMEM
- § Superfect (Qiagen, USA)
- § PBS (9g NaCl, 20 ml tampon phosphate 0,5M, eau distillée, pH 7,4 pour 1l)
- § Milieu DHG-L1 (Invitrogen)
- § Milieu CO₂ indépendant complet
- § Dual luciférase assay (Promega, USA)
 - Ø Passive Lysis Buffer
 - Ø LAR
 - Ø Solution Stop and Glo
- § Luminomètre (Berthold)

10.3. Méthode

Les cellules sont repiquées la veille dans des plaques 24 puits à une densité de 120000 cellules par puits. Le lendemain, la solution de transfection est préparée. Cette solution est

constituée, pour chaque puits, de 60 µl d'optiMEM auxquels est ajouté 1 µg d'ADN. Cet ADN comprend 1/3 de plasmide Rénilla et 2/3 de plasmiderapporteur. Après 5 minutes, 0,6 µl de superfect est additionné. 15 minutes après l'ajout de superfect, 360 µl d'optimem + 5,9% de sérum est ajouté. Les cellules sont ensuite rincées une fois avec 1 ml de PBS. Chaque puits est alors décanté et 420 µl de solution de transfection y sont déposés. Les cellules sont alors incubées dans cette solution durant 3 heures. Au terme de ces 3 heures, les cellules sont rincées avec 1 ml de DHG-L1 seul puis placées dans du DHG-L1 contenant 10% de sérum jusqu'au jour suivant.

Les cellules sont par la suite incubées respectivement en hypoxie intermittente, en hypoxie chronique ainsi qu'en normoxie.

Une fois les incubations terminées, la révélation de l'activité des deux luciférase peut être réalisée. Pour ce faire, les puits sont décantés et 100 µl de Passive Lysis Buffer sont déposés dans chacun des puits, ce qui va permettre la lyse des cellules. Les plaques 24 puits sont ensuite agitées à l'aide d'un vortex durant 15 minutes. Une fois ce temps écoulé, les cellules sont splashées et récupérées dans un eppendorf. S'ensuit une centrifugation de 3 minutes à 13000 rpm. Le surnageant est alors récupéré et conservé dans un nouvel eppendorf.

100 µl de LAR sont alors dispensés dans des cuvettes pour luminomètre. 20 µl de lysat cellulaire sont alors ajoutés et une première mesure est réalisée à l'aide du luminomètre. Une fois la mesure affichée et notée, la cuvette est récupérée et 100 µl de Stop and Glo y sont déposés. Une deuxième mesure peut finalement avoir lieu. Les résultats seront finalement exprimés en tant que rapport de l'activité de la luciférase firefly sur l'activité de la luciférase Rénilla.

11. Dosage des radicaux libres

11.1. Principe

Le niveau de ROS intracellulaires a été estimé en utilisant une sonde sensible aux oxydants appelée H2DCF-DA. La cellule est perméable au H2DCF-DA qui est un précurseur non fluorescent de la 2',7'-dichlorofluorescéine (DCF). Des estérases cellulaires clivent le HDCF-DA au niveau de deux liaisons ester ce qui donne naissance à une molécule relativement polaire qui reste à l'intérieur de la cellule. S'il y a production de ROS intracellulaires, ceux-ci peuvent oxyder cette molécule en dichlorofluorescéine (DCF) qui fluoresce. Cette fluorescence émise est alors détectée grâce à un fluorimètre.

11.2. Matériel

- § Sonde DCF-DA (Invitrogen, USA)
- § PBS (9g NaCl, 20 ml tampon phosphate 0,5M, eau distillée, pH 7,4 pour 1l)
- § H₂O₂ (Merck, Allemagne)
- § Plaques 24 puits (Costar, Corning, USA)
- § Fluorimètre (Fluoroscanner Ascent)

11.3. Méthode

Les cellules sont repiquées la veille dans des plaques 24 puits, à une densité de 120000 cellules par puits.

La sonde est ajoutée au début des incubations à une concentration de 5µM, au moment où le milieu de culture est remplacé par du milieu CO₂ indépendant complet. La sonde est diluée

1000x dans le milieu CO₂ indépendant et 1 ml de ce mélange est déposé dans chacun des puits.

Un contrôle positif est également réalisé avec du H₂O₂. Celui-ci est dilué dans du milieu CO₂ indépendant contenant déjà la sonde pour obtenir une concentration finale de 0,5mM.

Les différentes boîtes sont alors incubées sous hypoxie et réoxygénation. Au terme de ces incubations, les boîtes sont récupérées et les puits sont rincés avec un ml de PBS. Le PBS est ensuite décanté et un ml de PBS est de nouveau ajouté. La fluorescence de chaque puits est alors mesurée à une longueur d'onde d'excitation 485nm et une longueur d'onde d'émission de 520nm. Chaque mesure est réalisée en triplicat.

Résultats et discussion

Nous avons vu que l'approvisionnement en oxygène des tumeurs solides est souvent réduit voir nul. De nombreuses études ont permis de postuler un rôle de l'hypoxie comme source majeure de radiorésistance des cellules tumorales. Par la suite, Martinive et al.(2007) ont démontré que l'hypoxie et principalement l'hypoxie intermittente confère également aux cellules endothéliales une résistance aux stress proapoptotiques. Elle leur confère également un phénotype angiogénique. L'hypoxie intermittente naît suite à l'occlusion temporaire d'un vaisseau sanguin provoquant l'interruption de l'approvisionnement en oxygène des cellules situées au-delà de cette obstruction. Cette anomalie est notamment due à des troubles de la microcirculation. Lors de ce mémoire, nous avons étudié l'effet de l'hypoxie intermittente sur les cellules endothéliales, l'objectif étant de découvrir les mécanismes qui pourraient être responsables de la protection constatée par Martinive et al. Pour ce faire, nous allons étudier dans une première partie, trois facteurs de transcription nommés HIF1, NF- κ B et Nrf2 dont l'activité pourrait être régulée par l'hypoxie intermittente. Dans la deuxième partie, nous étudierons des variations d'expression de gènes afin de déterminer si l'hypoxie intermittente est susceptible de jouer un rôle dans la néo-angiogenèse.

Caractérisation du modèle

1. Evaluation de la viabilité cellulaire des cellules

Avant de commencer à étudier l'activité des facteurs de transcription, nous avons voulu nous assurer que l'hypoxie intermittente ou l'hypoxie chronique n'entraînait pas de la mort cellulaire. Nous avons donc réalisé une expérience afin d'estimer la viabilité des cellules ayant subi des incubations en normoxie, en hypoxie intermittente ou en hypoxie chronique. Pour ce faire, les cellules EAhy926 ont étéensemencées dans des plaques 24 puits à une densité de 50000 cellules par puits. Elles ont ensuite été placées en normoxie, en hypoxie intermittente ou en hypoxie chronique durant 6h. Au terme des incubations, un mélange de bromure d'éthidium et d'acrydine orange a été ajouté dans chaque puits. Un comptage des cellules colorées en vert (vivantes) et des cellules colorées en rouge (mortes) a alors été effectué afin de déterminer le pourcentage de mortalité.

Les résultats (figure 1) montrent que l'hypoxie intermittente ainsi que l'hypoxie chronique ne provoquent pas d'augmentation de la mortalité cellulaire. Il semblerait même que suite à l'hypoxie intermittente ou à l'hypoxie chronique, le nombre de cellules mortes soit moins élevé que celui obtenu suite à une incubation en normoxie. Ce qui pourrait nous laisser penser que l'hypoxie intermittente ainsi que l'hypoxie chronique pourraient conférer aux cellules une meilleure viabilité, ce qui avait déjà été observé par Martinive et al. (2007).

2. Dosage des radicaux libres

Au cours de l'incubation en hypoxie intermittente, les cellules subissent des cycles successifs d'hypoxie et de réoxygénation. Les phases de réoxygénation sont susceptibles de générer une production plus importante de ROS qui pourraient avoir de nombreuses activités dans les cellules. Nous avons donc voulu savoir si c'était effectivement le cas.

Nous avons tout d'abord décidé de réaliser une cinétique courte de deux cycles d'hypoxie intermittente afin de déterminer s'il existait des variations de la production de radicaux libres au cours de notre cinétique. Pour ce faire, les cellules ont été incubées en hypoxie intermittente pendant 3 heures et un dosage des radicaux libres fut réalisé après chaque étape (hypoxie et réoxygénation) du cycle. Une réoxygénation d'une heure à la fin de notre cinétique a également été réalisée afin de déterminer si des périodes de réoxygénation plus longues entraînaient une production plus élevée de ROS. Des incubations en normoxie correspondant à chaque étape ont été effectuées en parallèle.

Le dosage des radicaux libre a pu être réalisé grâce à une sonde $H_2DCF-DA$ qui est sensible à l'oxydation. Sous cette forme, elle peut pénétrer à l'intérieur de la cellule et est non fluorescente. Une fois à l'intérieur de la cellule, la sonde est clivée au niveau d'une liaison ester par des estérases, ce qui la rend relativement polaire et la maintient à l'intérieur de la cellule. Finalement, s'il y a présence d'oxydants, la sonde est oxydée sous forme de DCF et émet de la fluorescence. Une mesure de la fluorescence permet donc d'estimer le taux intracellulaire de ROS.

Les cellules ont été incubées en présence de la sonde dès le début de la cinétique. Cette sonde est donc présente tout au long des incubations.

Les résultats obtenus (figure 2) montrent que la production de radicaux libres varie au cours de notre cinétique. Il y a une augmentation de la quantité de ROS lors des phases de réoxygénation et nous constatons que celle-ci est d'autant plus marquée que la réoxygénation est longue : une heure par rapport à 30 minutes.

Nous avons recommencé l'expérience en réalisant l'entièreté de la cinétique (4 cycles) afin de confirmer ces résultats et d'évaluer les variations de production de ROS tout au long de l'incubation en hypoxie intermittente.

Les cellules ont été incubées en hypoxie intermittente pendant 6h. Un dosage des radicaux libres a de nouveau été effectué après chaque étape de la cinétique. Les cellules ont également été stimulées avec du H_2O_2 pendant 15, 30 et 60 minutes utilisé comme contrôle positif. Une hypoxie chronique de 6h a aussi été réalisée. Les autres conditions sont identiques à celles réalisées lors de la première expérience, à la différence que la cinétique est plus longue.

Nous constatons que les résultats (figure 3) sont semblables à ceux obtenus lors de la première expérience. Nous remarquons toujours une augmentation des ROS lors des phases de réoxygénation mais cette élévation semble moins marquée que la première fois et s'estompe au fur et à mesure des cycles. La réoxygénation d'une heure à la fin de la cinétique ne montre cependant ici pas d'augmentation dans la production des radicaux libres tel que c'était le cas la première fois. Nous observons que le contrôle positif a bien fonctionné. Il présente une augmentation du taux intracellulaire de ROS après 15 et 30 minutes. Par contre, après une heure, la quantité de ROS chute, soit parce que la sonde est saturée et détruite, soit parce

qu'elle est éliminée des cellules. Les cellules ayant subi une hypoxie chronique montrent quant à elles une très faible production de radicaux libres.

Ces dosages nous permettent de conclure qu'il y a une production de radicaux libre suite à la réoxygénation et que cette production semble la plus importante après la première phase d'hypoxie et semble augmenter avec la durée de cette phase de réoxygénation.

1. Etude de trois facteurs de transcription : HIF1, Nrf2, NF-κB

1.1. Etude de l'abondance et de la localisation des facteurs de transcription Nrf2, NF-κB et de la protéine HIF-1α par Western Blot

Nous avons suivi l'abondance et la localisation de ces différentes protéines par Western Blot (figure 4). Pour ce faire, les cellules ont été incubées 6 h en hypoxie intermittente (4 cycles), 6h en hypoxie chronique et 6h en normoxie. Une extraction par centrifugation différentielle a ensuite été réalisée afin d'obtenir des extraits cytoplasmiques et des extraits nucléaires. En ce qui concerne l'hypoxie intermittente, les extractions ont été réalisées après la dernière hypoxie et après la dernière réoxygénation.

L'objectif de l'extraction par centrifugation différentielle était de permettre de déterminer si la localisation des protéines HIF-1α, Nrf2 et NF-κB était nucléaire ou cytoplasmique lors des différentes conditions testées, et donc de peut-être observer une translocation nucléaire.

En ce qui concerne la protéine HIF-1α, elle est connue dans la littérature comme étant stabilisée et transloquée dans le noyau suite à l'hypoxie. En normoxie par contre, le temps de demi-vie cellulaire de HIF-1α est d'environ 5 minutes et elle n'est pas détectable par western blot. Les résultats obtenus par Western Blot sont en totale corrélation avec ces observations. En effet, nous remarquons que suite à la normoxie de 6h, HIF-1α n'est présent ni dans la fraction nucléaire, ni dans la fraction cytosolique. Cela se comprend aisément étant donné que dans ces conditions, cette protéine est dégradée par le protéasome. Les résultats obtenus suite à la réoxygénation sont identiques. Ces résultats sont facilement interprétables étant donné que la phase de réoxygénation dure 30 minutes et le temps de demi-vie HIF-1α est de 5 minutes.

Par contre, suite à l'hypoxie intermittente et à l'hypoxie chronique, la protéine HIF-1α est localisée dans le noyau, ce qui confirme que l'hypoxie induit la stabilisation et la translocation nucléaire de HIF-1α.

Suite aux résultats obtenus grâce au dosage des radicaux libres qui montraient une production de ROS lors des phases de réoxygénation, nous nous sommes également intéressés à la localisation de deux autres facteurs de transcription respectivement Nrf2 et NF-κB. Tel que mentionné précédemment, ces derniers sont connus comme étant activés par la production de radicaux libres et dans ce cas, ils migrent tous les deux dans le noyau. Nous espérons dès lors observer une translocation nucléaire de ces deux protéines lors de la réoxygénation.

Les Western Blot de Nrf2 et NF- κ B (p65) montrent que, quelle que soit la condition testée, la localisation de la protéine est principalement cytoplasmique. Nous n'observons pas de translocation nucléaire suite à la réoxygénation d'aucune de ces deux protéines.

1.2. Etude de la localisation subcellulaire de HIF-1 α , Nrf2, NF- κ B

Afin de confirmer les résultats obtenus dans l'expérience précédente, un marquage en immunofluorescence a été réalisé afin de localiser ces différentes protéines in situ au sein des cellules après les différentes incubations. Les cellules ont été incubées 6h en hypoxie intermittente, en hypoxie chronique ou en normoxie. Les cellules sont ensuite fixées et perméabilisées. Pour ce qui est de l'hypoxie intermittente, les cellules ont été fixées après chaque étape de la cinétique, c'est-à-dire après chaque phase d'hypoxie et chaque phase de réoxygénation.

La protéine d'intérêt a été visualisée grâce à un anticorps primaire spécifique de cette protéine et à un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome qui permet de marquer la protéine d'intérêt en vert. Nous avons également réalisé un marquage au TOPRO qui colore les noyaux des cellules en bleu afin de mieux localiser la protéine d'intérêt.

En ce qui concerne HIF-1 α (figure 5), nous constatons qu'en normoxie, aucun marquage n'est visible, ce que nous attendions étant donné que dans ces conditions, HIF-1 α est dégradé par le protéasome. Suite à l'hypoxie intermittente par contre, nous remarquons que lors des phases d'hypoxie, la protéine est stabilisée. De plus, la localisation de la protéine est nucléaire et l'intensité du marquage augmente au cours des cycles. Cependant, lors des phases de réoxygénation, aucun marquage n'est visible, ce qui nous laisse penser que la protéine est rapidement dégradée.

Une incubation des cellules de 6 heures en hypoxie chronique montre un marquage nucléaire de la protéine et ce marquage paraît plus prononcé que lors des phases d'hypoxie de l'hypoxie intermittente. Ceci peut certainement s'expliquer par l'absence dans ces conditions des phases de réoxygénation. Pour HIF-1 α , les résultats obtenus grâce à cette immunofluorescence confirment les résultats observés suite au Western Blot.

Les observations du marquage du facteur de transcription Nrf2 (figure 6) semblent également cohérentes avec les résultats obtenus par Western Blot. Nous constatons que, quelle que soit la condition testée, le marquage est principalement cytoplasmique. Au cours des phases d'hypoxie intermittente/réoxygénation, aucune translocation n'est perceptible. Le marquage est cytoplasmique et l'abondance de la protéine semble diminuer au fur et à mesure des cycles d'hypoxie intermittente, indiquant une diminution de l'abondance de Nrf2. On observe cependant au cours de l'hypoxie intermittente un anneau périnucléaire qui n'est pas présent lors de l'hypoxie chronique ni lors de la normoxie. Le mécanisme responsable de cette relocalisation n'est pas connu.

Les images obtenues suite à l'incubation des cellules en hypoxie chronique sont semblables à celles obtenues en normoxie mais la diminution de l'abondance de la protéine Nrf2 semble plus prononcée que celle observée en hypoxie intermittente.

Enfin, l'immunofluorescence de NF- κ B (figure 7) montre un marquage cytoplasmique avec une exclusion nucléaire bien marquée. Tout comme pour Nrf2, aucune translocation n'est observable au cours des cycles d'hypoxie intermittente ni en hypoxie chronique. Un contrôle

positif a également été réalisé. Il s'agit d'une incubation en présence de $\text{TNF}\alpha$ connu pour activer NF- κ B. Ce contrôle positif a bien fonctionné puisque la localisation de NF- κ B suite à la stimulation au $\text{TNF}\alpha$ apparaît nettement nucléaire.

En conclusion, l'ensemble des résultats obtenus jusqu'à présent indiquent que les phases d'hypoxie pendant l'hypoxie intermittente conduisent à une nette stabilisation de HIF-1 α . Par contre, la protéine est rapidement dégradée pendant les réoxygénations. D'autre part, ni les phases d'hypoxie, ni les phases de réoxygénation n'entraînent l'activation de Nrf2 ou NF- κ B.

1.3. Etude de l'activité des facteurs de transcription HIF1, Nrf2 et NF κ B

Dans la suite du travail, nous avons voulu corrélérer l'abondance et la localisation subcellulaire de ces trois facteurs de transcription avec leur activité. Dans un premier temps, nous avons mesuré leur activité de liaison à l'ADN. Leur activité transcriptionnelle a été évaluée dans la suite du travail.

1.3.1. Etude de l'activité de liaison à l'ADN de HIF-1 α , Nrf2, et NF- κ B

Afin d'étudier l'activité de liaison à l'ADN de ces facteurs de transcription, les cellules ont été incubées en hypoxie intermittente, en normoxie ou en hypoxie chronique durant 6h. Une extraction nucléaire a ensuite été réalisée. En ce qui concerne les cellules incubées en hypoxie intermittente, l'extraction nucléaire a été effectuée après chaque étape (hypoxie et réoxygénation) du premier cycle ainsi qu'après le quatrième cycle.

Les protéines nucléaires furent ensuite déposées dans des puits coatés avec des molécules d'ADN possédant la séquence consensus reconnue spécifiquement par le facteur de transcription étudié. Lorsque le facteur de transcription est présent, il se lie sur cette séquence. Cette liaison est visualisable grâce à un anticorps primaire dirigé contre le facteur de transcription d'intérêt, qui est lui-même reconnu par un anticorps secondaire couplé à une peroxydase. L'ajout du substrat de l'enzyme donne alors une mesure colorimétrique permettant d'estimer la liaison à l'ADN du facteur de transcription étudié (figure 8).

Le facteur de transcription HIF-1 est connu pour être activé en hypoxie, et pour se lier à l'ADN et ainsi augmenter la transcription de nombreux gènes impliqués dans l'adaptation et la survie de la cellule au manque d'oxygène.

La liaison de HIF-1 α est augmentée lors des phases d'hypoxie intermittente, que ce soit après le cycle 1 ou le cycle 4. Cette augmentation est également observée, de façon plus marquée, suite à l'hypoxie chronique mais pas pendant les phases de réoxygénation.

Ces résultats concordent avec les résultats obtenus en immunofluorescence ainsi que par western Blot et montrent une activation de HIF-1 dans ces conditions.

En ce qui concerne Nrf2, aucune variation de la liaison de ce facteur de transcription à sa séquence consensus n'est observable dans aucune des différentes conditions étudiées. Contrairement à l'hypothèse de départ, il n'y a pas d'augmentation de la liaison à l'ADN lors des phases de réoxygénation de l'hypoxie intermittente. Nous pouvons simplement signaler une légère diminution de la liaison de Nrf2 à l'ADN lors du cycle 4 et après 6h d'hypoxie

chronique. Ceci coïncide avec la diminution de l'abondance de Nrf2 observée au fur et à mesure de la cinétique à l'aide du marquage en immunofluorescence.

La liaison de NF- κ B à sa séquence consensus ne semble pas varier non plus lors des différentes conditions si nous la comparons aux résultats obtenus en normoxie. Nous pouvons uniquement noter une légère augmentation de la liaison de NF- κ B à l'ADN suite à la réoxygénation du cycle 1. Cette augmentation n'est cependant pas corrélée à une translocation nucléaire de la sous-unité p65 (voir figure 7).

1.3.2. Etude de l'activité des facteurs de transcription HIF-1, Nrf2 et NF- κ B par système rapporteur

Suite à l'étude de la liaison de ces différents facteurs de transcription à leur séquence consensus respective, nous avons étudié l'activité transcriptionnelle de ces facteurs. Pour cela, nous avons utilisé un système rapporteur. Les cellules ont été transfectées avec un premier plasmide contenant le gène codant pour la luciférase. Ce dernier est placé sous le contrôle d'un promoteur artificiel contenant des séquences consensus reconnues soit par HIF-1, soit par Nrf2, soit par NF- κ B. Un second plasmide (pRL) a également été introduit. Il encode pour la luciférase de Rénilla sous l'influence d'un promoteur fort et constitutif et servira donc à la normalisation. Une fois la transfection effectuée, les cellules transfectées sont incubées en normoxie, en hypoxie intermittente (5 cycles) ou en hypoxie chronique pendant 7h30. L'activité des deux luciférases est finalement mesurée en luminescence.

Nous constatons sur la figure 9 que l'activité transcriptionnelle de HIF-1 est augmentée que ce soit en hypoxie intermittente ou en hypoxie chronique 7h30.

Une condition supplémentaire a également été ajoutée pour l'étude de l'activité de transcription de HIF-1. Il s'agit d'une hypoxie chronique de 16 heures. Nous constatons que dans cette condition, l'activité transcriptionnelle de HIF-1 est élevée et est 14 fois supérieure à celle observée en normoxie.

Cette expérience nous permet donc à nouveau de confirmer les résultats obtenus précédemment qui montrent que l'hypoxie intermittente active HIF-1.

L'étude de l'activité de Nrf2 par système rapporteur permet également de confirmer les résultats obtenus précédemment. Nous constatons qu'il n'y a pas de variation de l'activité transcriptionnelle de Nrf2 entre les différentes conditions expérimentales. Ni l'hypoxie intermittente ni l'hypoxie chronique ne semble pas augmenter l'activité de transcription du facteur de transcription Nrf2. Un contrôle positif a également été réalisé. Il s'agit du TBHQ connu pour entraîner l'activation de la transcription de Nrf2. Le TBHQ induit bien une augmentation de l'activité de transcription de Nrf2, indiquant que ce système rapporteur est bien capable de détecter une augmentation de l'activité de Nrf2.

En ce qui concerne NF- κ B, il semblerait que l'hypoxie intermittente diminue son activité transcriptionnelle en comparaison avec la normoxie. L'hypoxie chronique n'a, par contre, pas d'effet. Le contrôle positif en présence de TNF α a bien fonctionné puisqu'on constate une augmentation de l'activité luciférase par rapport à la normoxie.

Ces résultats montrent à nouveau que l'hypoxie intermittente n'engendre pas d'activation de Nrf2 et NF- κ B.

1.3.3. Etude de l'activité des facteurs de transcription par suivi de l'expression de gènes cibles

Comme nous le savons, l'expression d'un gène peut-être régulée à différents niveaux. L'un des processus majeurs de régulation est assuré par les facteurs de transcription qui se fixent au niveau de séquences d'ADN conservées présentes dans le promoteur de leurs gènes cibles. Ces facteurs permettent l'ouverture de la double hélice d'ADN pour augmenter la transcription de ces gènes.

Nous avons donc décidé d'étudier l'expression de gènes qui présentent dans leur promoteur un site HRE, ARE ou κ B afin d'estimer l'activité respective des facteurs de transcription HIF-1, Nrf2 ou NF- κ B dans les différentes conditions expérimentales. Pour ce faire, les cellules ont été incubées en hypoxie intermittente (5 cycles), en hypoxie chronique ou en normoxie pendant 7h30. L'ARN total a ensuite été extrait des cellules. Pour ce qui est de l'hypoxie intermittente, l'extraction a été réalisée après l'hypoxie et après la réoxygénation qui suit le dernier cycle. Lors du dernier cycle, les cellules ont été réoxygénées 1 heure. L'ARNm a ensuite été rétrotranscrit en ADNc. La PCR en temps réel fut ensuite effectuée : elle permet une amplification de l'ADNc grâce à des amorces spécifiques de l'ARNm d'intérêt. L'abondance de l'ADN produit est déterminée grâce à la mesure d'un signal fluorescent émis par un agent intercalant appelé le SYBR green. Les résultats obtenus furent normalisés par rapport à l' α -tubuline.

Nous avons suivi l'expression de deux gènes cibles de HIF-1 (Aldolase et Glut1), de quatre gènes cibles de Nrf2 (HO-1, GSTP1, GCS et NQO1), et d'un gène cible de NF- κ B (IL8).

Nous remarquons (figure 10) que l'expression de Glut1 est augmentée en hypoxie intermittente ainsi qu'en hypoxie chronique en comparaison avec la normoxie. L'étude du gène de l'aldolase montre une augmentation de son expression en hypoxie chronique mais aucune augmentation n'est visible suite à l'hypoxie intermittente. Une cinétique plus longue d'hypoxie intermittente aurait peut-être permis de visualiser une augmentation de son expression.

L'expression de l'ensemble des gènes cibles de Nrf2 (figure 11) est quant à elle réprimée en hypoxie intermittente et en hypoxie chronique. Seuls les résultats obtenus pour le gène GCS montre une augmentation de son expression en hypoxie intermittente et en réoxygénation. Cela pourrait peut-être s'expliquer par la présence dans le promoteur de ce gène, d'un site de liaison pour un facteur de transcription autre que Nrf2 qui serait activé dans ces conditions.

Pour ce qui est du gène IL8 (figure 12), gène cible de NF- κ B, nous remarquons que quelle que soit la condition étudiée, son expression est diminuée d'environ deux fois par rapport à la normoxie.

Conclusion

La première partie de ce mémoire avait pour but d'étudier l'effet de l'hypoxie intermittente et de l'hypoxie chronique sur l'activité des facteurs de transcription HIF1, Nrf2 et NF- κ B dans les cellules EAhy926. A partir de ces premiers résultats obtenus, nous pouvons déjà tirer quelques conclusions.

Nous constatons tout d'abord que l'hypoxie intermittente entraîne la stabilisation de HIF-1 α ainsi que sa translocation nucléaire et sa liaison à l'ADN. Elle provoque également une augmentation de l'activité de HIF-1 et de l'expression de ses gènes cibles.

L'hypoxie chronique a un effet similaire sur l'activité de HIF1 mais cet effet semble plus prononcé, ce qui peut certainement s'expliquer par l'absence des phases réoxygénation dans ces conditions, réoxygénations qui engendrent à chaque fois une dégradation de HIF-1 α .

En ce qui concerne Nrf2, nous pouvons mentionner que l'hypoxie suivie d'une réoxygénation n'entraîne pas la translocation nucléaire de ce facteur de transcription. En avançant dans les cycles d'hypoxie intermittente, nous remarquons une diminution de l'abondance de cette protéine ainsi qu'une diminution de la liaison de Nrf2 à sa séquence consensus. Ni l'hypoxie intermittente, ni l'hypoxie chronique ne semble modifier l'activité transcriptionnelle de ce facteur mesurée à l'aide d'un système rapporteur, mais on observe cependant une légère diminution de l'abondance de l'ARNm de certains gènes cibles de Nrf2. L'hypoxie chronique semble entraîner une diminution de l'abondance de Nrf2 plus marquée.

L'ensemble des résultats des expériences réalisées sur NF- κ B suggère que les phases d'hypoxie et réoxygénation n'entraînent pas sa translocation nucléaire. Les cycles d'hypoxie intermittente sembleraient diminuer son activité et l'expression d'un de ces gènes cibles, l'IL8, contrairement à ce que l'on avait postulé au départ.

2. Etude de l'expression de gènes impliqué dans l'inflammation et la néo-angiogenèse

Les résultats décrits dans la première partie du travail montrent qu'au moins un facteur de transcription voit son activité modifiée en hypoxie intermittente, il s'agit de HIF-1.

Par ailleurs, nous avons signalé précédemment que Martinive et al. (2007) avaient observé que ces conditions d'hypoxie intermittente étaient capables d'induire un changement du comportement des cellules endothéliales vers un phénotype angiogénique. Nous avons donc voulu, dans la deuxième partie de ce travail, étudier les changements de l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation ou dans l'angiogenèse induits lorsque les cellules endothéliales sont incubées en hypoxie intermittente ou en hypoxie chronique. Nous avons étudié l'inflammation parce que les phénotypes activés par l'inflammation et par l'angiogenèse se recoupent. Pour cela, nous avons utilisé deux méthodes : le microdamier « Dualchip human inflammation » ainsi que des cartes microfluidiques. Le damier inflammation regroupe des sondes de capture pour 310 gènes qui sont des indicateurs des réactions inflammatoires. Les résultats obtenus pour certains gènes pour lesquels des variations d'expression ont été observées à l'aide des microdamiers ont ensuite été vérifiés par PCR en temps réel. Nous avons par la suite utilisé des cartes microfluidiques qui nous ont permis, quant à elles, d'étudier des variations d'expression de gènes plus spécifiques de l'angiogenèse et qui n'étaient pas détectables avec les microdamiers. Les résultats obtenus à l'aide des cartes microfluidiques vont également permettre de confirmer certains résultats obtenus suite à l'hybridation des échantillons sur la « Dualchip human inflammation ».

2.1. Etude de l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation au moyen la Dualchip

Pour réaliser cette étude, les cellules ont été incubées 7h30 en hypoxie intermittente (5 cycles), en hypoxie chronique ou en normoxie dans du milieu CO₂ indépendant. Une fois les incubations terminées, l'ARN total fut extrait et son intégrité vérifiée grâce à l'Agilent. Pour l'hypoxie intermittente, l'ARN a été extrait soit directement après la dernière phase d'hypoxie, soit après une heure de réoxygénation. L'ARN total est ensuite rétrotranscrit en ADNc et le produit de cette rétrotranscription est ensuite hybridé sur la « Dualchip inflammation ». Après lavages et séchage, les signaux émis par la cyanine 3 sont finalement détectés, quantifiés et analysés. Il est important de signaler que pour cette expérience, nous avons réalisé de vrais triples d'incubation- extraction- hybridation. Pour chaque gène, les valeurs obtenues ont été analysées pour chaque condition en comparaison avec la normoxie.

Ne seront prises en compte que les variations de gènes qui sont quantitatives significative c'est-à-dire les valeurs représentées en jaune ou qualitatives significatives c'est-à-dire représentées en vert dans les tableaux.

L'hypoxie est connue pour diminuer de manière générale la transcription et la traduction. On constate en effet sur le tableau 1 que l'hypoxie chronique entraîne une diminution de l'expression d'une série de gènes impliqués dans l'inflammation. Il s'agit des gènes AMH, BAG3, CCL2, CDKN1A, EGR1, FOSL1, HBEGF, HIF1A, HRAS, IRF1, PGF, THBD, TFRC.

Cependant, notamment grâce à l'activation du facteur HIF1, certains gènes sont induits en hypoxie afin de mettre en place une réponse adaptative des cellules. Le VEGF et l'aldolase sont connus pour être inductible en hypoxie et sont des gènes cible de HIF1. Nous observons une augmentation significative de leur expression en hypoxie chronique ce qui valide nos résultats. D'autres gènes s'avèrent également être surexprimés suite à l'hypoxie chronique. Il s'agit des gènes MAP2K7, RUNX1 et FAS. Ces gènes varient de manière qualitative significative ce qui signifie que l'on ne peut pas tenir compte des valeurs. Cela est dû au fait que ces gènes ne sont pas suffisamment exprimés pour être détectés en normoxie mais le sont en hypoxie chronique, il y a donc surexpression mais un ratio ne peut être calculé.

Nous remarquons que l'hypoxie intermittente (tableau 2) semble, quant à elle, aussi engendrer une diminution de l'expression de gènes et ce, de façon plus marquée que l'hypoxie chronique. 16 gènes détectables sur le microdamier voient en effet leur expression diminuer. Parmi ceux-ci, nous retrouvons BAG3, CEBPB, CSF2, EPOR, FADD, FLT4, FOSL1, ICAM3, ISGF3G, JUN, NRG1, PDGFB, TAP1, THBD, TNFRSF1A, TRAF2. On constate que ces gènes sont pour la plupart différents de ceux qui s'avéraient être sous-exprimés suite à l'hypoxie chronique. Ces diminutions d'expression semblent donc spécifiques à l'hypoxie intermittente.

Par contre, sept gènes voient leur expression augmenter dans ces conditions. Il s'agit des gènes BDNF, EPHB2, FGF2, F2R, IL15, IRF1, MAP2K7 et PLAA. En hypoxie chronique, ces surexpressions n'étaient pas détectées. Elles sont donc caractéristiques de l'hypoxie intermittente. Notons également que l'expression du gène IRF1 était sous-exprimée en hypoxie chronique alors qu'en hypoxie intermittente, il voit son expression augmenter.

Enfin, la surexpression d'un gène qui est constatée suite à l'hypoxie intermittente était également observée en hypoxie chronique. Il s'agit de l'augmentation de l'expression du gène RUNX1.

La plupart des effets observés suite à l'incubation des cellules à une heure de réoxygénation sont similaires à ceux observés pour les cellules incubées en hypoxie intermittente. Les gènes BAG3, FOSL1, ICAM3, ISGF3G, JUN, NRG1, THBD, TNFRSF1A voient à nouveau leur expression diminuer. Cependant, d'autres sous-expressions apparaissent. Les gènes ATF2, IRF3 et PGF sont réprimés suite à la réoxygénation. Cette tendance existait déjà suite aux phases d'hypoxie de l'hypoxie intermittente mais l'effet est plus marqué après la dernière phase de réoxygénation de 1 heure (tableau 3).

Les gènes BDNF, F2R, IL15, MAP2K7, PLAA et RUNX1 s'avèrent de nouveau être surexprimés tel qu'observé lors de l'hypoxie intermittente. Cependant, certaines augmentations ne sont plus détectables suite à la réoxygénation (IRF1) et d'autres apparaissent alors que ce n'était pas probant en hypoxie intermittente. C'est notamment le cas du VEGF dont l'expression apparaît augmenter de manière claire.

Le tableau 4 reprend les gènes dont l'expression varie dans au moins une des conditions.

Une constatation que nous pouvons faire à partir de ce tableau 4, est que certaines variations d'expression de gènes sont communes aux conditions (BAG3, FOSL1, MAP2K7, RUNX1 THBD) tandis que d'autres variations d'expression sont spécifiques pour l'une ou l'autre condition.

Nous remarquons que FOSL1 et THBD sont réprimés quelle que soit la condition étudiée. L'expression de MAP2K7 et RUNX1 augmente quant à elle quelle que soit la condition expérimentale.

Nous remarquons cependant que certaines surexpressions de gènes sont propres à l'hypoxie intermittente car on observe une augmentation de leur expression lors de la phase d'hypoxie et de réoxygénation de l'hypoxie intermittente mais pas lors de l'hypoxie chronique. C'est notamment le cas des gènes F2R, BDNF, IL15, PLAA. Cependant, l'hypoxie intermittente semble également liée à la répression de certains gènes tels que ICAM3, ISGF3G, JUN, NRG1, TNFRSF1A dont l'expression diminue suite aux phases d'hypoxie ou de réoxygénation de l'hypoxie intermittente mais dont l'expression ne change pas suite à l'hypoxie chronique.

L'augmentation de l'expression du gène IFNAR1 ne s'observe que suite à la réoxygénation.

Enfin, des variations de gènes semblent également propres à l'hypoxie chronique car on n'observe une augmentation de leur expression uniquement lors de l'hypoxie chronique et pas lors de l'hypoxie intermittente. C'est notamment le cas du gène FAS qui est surexprimé suite à l'hypoxie chronique et n'était pas détecté dans les autres conditions expérimentales. Ce qui signifie que dans les autres conditions, l'expression de ce gène est fortement diminuée. Ces résultats suggèrent que l'hypoxie chronique et l'hypoxie intermittente engendrent la surexpression de gènes différents.

2.2. Vérification des variations d'expression de la THBD par real-time PCR

Afin de confirmer les résultats obtenus à l'aide de la « Dualchip human inflammation », une PCR en temps réel a été réalisée après rétrotranscription pour quantifier l'ARNm d'un gène pour lequel des variations d'expression ont été détectées dans les trois conditions à l'aide de la dualchip. Il s'agit du gène THBD, qui s'avérait être réprimé après une incubation en hypoxie intermittente, en hypoxie chronique ainsi que suite à la dernière phase de réoxygénation.

Pour ce faire, les cellules EAhy926 ont été incubées pendant 7h30 en normoxie, en hypoxie intermittente ou en hypoxie chronique. L'ARN total a ensuite été extrait des cellules et l'ARNm a été rétrotranscrit en ADNc grâce à une amorce polyT. Pour ce qui est de l'hypoxie intermittente, l'extraction a été réalisée directement après l'hypoxie et suite à une réoxygénation de 1 heure. La PCR en temps réel a ensuite été effectuée grâce à des amorces spécifiques de l'ARNm de THBD. Les résultats obtenus furent normalisés par rapport à l'ARNm de l' α -tubuline et sont représentés à la figure 12.

Les résultats obtenus par real time RT-PCR confirment les résultats obtenus grâce au microdamier. Nous remarquons que quelle que soit la condition étudiée, l'expression du gène THBD est réprimée. Nous pouvons mentionner que la répression de ce gène semble légèrement plus importante en hypoxie chronique, ce qui de nouveau concorde avec les résultats obtenus avec le microdamier. Les niveaux de répression quantifiés par real time PCR semblent très proches de ceux obtenus suite à l'analyse des microdamiers. Il faut noter que les house keeping genes utilisés pour la normalisation dans les deux méthodes sont différents : il s'agit de la tubuline α pour la PCR en temps réel et pour les microdamiers, les deux house keeping genes sont PPIE et TFRC.

2.3. Etude de l'expression de gènes impliqués dans l'angiogenèse à l'aide de cartes microfluidiques

Les résultats obtenus à l'aide des microdamiers suggèrent que l'hypoxie intermittente n'induit pas les mêmes variations d'expression de gènes que l'hypoxie chronique, ce qui est une observation très intéressante. Afin de compléter cette étude, nous avons utilisé des cartes microfluidiques. Ces cartes permettent de réaliser des réactions de real time PCR pour 48 gènes en parallèle. Cette technologie Taqman Low-Density array permet donc de déterminer le profil d'expression de plusieurs gènes dans un même échantillon d'ARN.

Pour ce faire, les cellules EAhy926 ont été incubées 7h30 en hypoxie intermittente, en hypoxie chronique ou en normoxie. Au terme des incubations, l'ARN total fut extrait. Pour ce qui est de l'hypoxie intermittente, ce dernier a été extrait après l'hypoxie et la réoxygénation du dernier cycle. L'ARNm a ensuite été rétrotranscrit en ADNc à l'aide de primers aléatoires. Les échantillons sont ensuite injectés dans la carte microfluidique. Nous avons utilisé des cartes microfluidiques contenant des primers permettant d'amplifier l'ADNc de 48 gènes impliqués dans l'inflammation et la néoangiogenèse.

L'ensemble des résultats est résumé dans le tableau 5. Certains gènes qui n'étaient pas détectés sur la dualchip human inflammation le deviennent grâce aux cartes microfluidiques. 10 gènes sur 42 détectables l'ont été à l'aide des microdamiers tandis que 27 sur 48 le furent à l'aide des cartes microfluidiques. Ces dernières sont en effet plus sensibles que les damiers car il s'agit de réactions de PCR en temps réel (technique par amplification) qui permettent une quantification de quantités plus faibles d'ARNm grâce à cette amplification.

La figure 13 reprend les résultats obtenus pour les ARNm détectés à l'aide des cartes. Pour les gènes qui étaient détectés grâce aux microdamiers, on observe une bonne corrélation entre ces résultats et ceux obtenus grâce aux cartes microfluidiques. On remarque par exemple que CCL2 est réprimé en hypoxie chronique et surexprimé en réoxygénation ce qui était également détecté avec le microdamier. Cependant, le microdamier ne permettait pas de détecter ce gène suite à l'hypoxie intermittente. Les cartes microfluidiques nous donnent donc une information supplémentaire, on observe que suite à l'hypoxie intermittente, CCL2 est très légèrement réprimé.

Grâce au microdamier, on observait également une augmentation de l'expression de F2R suite à la réoxygénation et à l'hypoxie intermittente. Ceci est confirmé grâce aux cartes microfluidiques qui montrent une augmentation de l'expression de F2R dans ces deux conditions.

De même, les résultats précédents sur microdamiers et par real time RT PCR montraient que l'expression de THBD était diminuée dans les trois conditions testées, ce qui est à nouveau confirmé grâce aux résultats obtenus avec les cartes microfluidiques. En conclusion, nous remarquons de manière générale que les résultats obtenus pour les gènes détectés à la fois avec les cartes microfluidiques et les damiers sont assez semblables.

En ce qui concerne les gènes qui n'avaient pas encore été détectés, nous remarquons premièrement que certains gènes varient dans le même sens dans les trois conditions expérimentales. Certains voient leur expression augmenter quelle que soit la condition expérimentale. C'est notamment le cas des gènes FGF2, HTATIP, IRF3 et RPS9. D'autres voient leur expression réprimée à la fois en hypoxie intermittente, en hypoxie chronique et en réoxygénation. Il s'agit des gènes CSF3, CXCL1, IL1A, IL1B, IL8.

Il semble cependant que les variations de certains gènes soient spécifiques de l'hypoxie intermittente, tandis que des variations d'autres gènes sont spécifiques à l'hypoxie chronique. En effet, l'expression de certains gènes augmente lors des phases d'hypoxie et des phases de réoxygénation de l'hypoxie intermittente mais diminue lors de l'hypoxie chronique et inversement. Un exemple est celui du gène CSF1. Ce gène voit son expression augmenter lors de la phase d'hypoxie et de réoxygénation de l'hypoxie intermittente. Par contre, suite à l'hypoxie chronique, il est réprimé. La surexpression de ce gène semble donc propre à l'hypoxie intermittente.

Les gènes IL6, IRF2, PPARA sont quant à eux surexprimés en hypoxie chronique et leur expression est diminuée en hypoxie intermittente. L'augmentation d'expression de ces gènes est donc caractéristique de l'hypoxie chronique.

GAPDH est quant à lui connu comme étant un gène cible de HIF1. On constate que son expression est augmentée suite à l'hypoxie chronique, ce qui confirme les résultats obtenus dans la première partie et représente un bon contrôle positif de l'hypoxie chronique.

Enfin l'expression de certains gènes ne semble pas varier quelle que soit la condition testée ou varier très peu. Parmi ces gènes, nous trouvons ICAM1, TIMP1 et TIMP2. ICAM1 est un gène cible de NF- κ B.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats met en évidence que l'hypoxie chronique et l'hypoxie intermittente influencent de manière différente l'expression des gènes impliqués dans l'inflammation et la néoangiogenèse.

Conclusions et perspectives

Le phénomène d'hypoxie s'avère être aujourd'hui très important dans la compréhension des mécanismes à la fois de vascularisation de la tumeur mais également de résistance des tumeurs vis-à-vis des traitements de radiothérapies et de chimiothérapies. L'hypoxie tumorale modifie en effet l'efficacité des thérapies anti-cancéreuses en inhibant l'apoptose et promeut la progression tumorale.

L'hypoxie peut être chronique et concerne principalement les cellules tumorales éloignées des vaisseaux sanguins auxquelles l'oxygène ne parvient plus.

Cependant, l'hypoxie tumorale peut aussi avoir lieu de manière transitoire. Des irrégularités de flux sanguin existent au sein des vaisseaux sanguins irriguant les tumeurs et sont en corrélation avec des changements dans la pression en oxygène des tissus et cellules environnantes. Ces fluctuations sont connues pour être provoquées par des occlusions transitoires et des rétrécissements des vaisseaux. L'architecture anormale du système vasculaire tumoral est également impliquée. Ces instabilités du flux sanguin peuvent avoir des conséquences dramatiques sur la distribution de l'oxygène aux tissus et cellules proches. Les cellules sont ainsi exposées à des phases d'hypoxie suivies de phases de réoxygénation. Les cellules endothéliales sont les premières concernées par cette hypoxie transitoire. Les cellules endothéliales sont en effet les principales cellules impliquées dans la formation de nouveaux capillaires au sein de la tumeur. En déclenchant une réponse adaptative à l'hypoxie, les cellules endothéliales contribuent à l'établissement de réponses angiogéniques impliquées dans la croissance tumorale. Les cellules endothéliales sont donc fortement impliquées dans le développement tumoral et sont la cible de thérapies antiangiogéniques qui ont pour but de d'asphyxier la tumeur en empêchant la formation de nouveaux vaisseaux.

Il s'avère de plus, que l'hypoxie et surtout l'hypoxie intermittente diminue la sensibilité des cellules tumorales et endothéliales à la radiothérapie. L'hypoxie intermittente peut en effet protéger les cellules endothéliales et tumorales contre la radiothérapie et les stress proapoptotiques (Martinive, Defresne et al. 2006). Nous avons voulu au cours de ce travail caractériser la réponse propre de l'endothélium à l'hypoxie intermittente. Afin de caractériser la réponse de l'endothélium dans ce contexte, nous avons étudié les effets d'une hypoxie intermittente ou d'une hypoxie prolongée sur la viabilité et le comportement angiogénique des cellules endothéliales EAhy926. Nous avons ainsi étudié l'influence de l'hypoxie prolongée et de l'hypoxie intermittente sur la viabilité cellulaire, sur l'activité de facteurs de transcription et sur l'expression d'une série de gènes dont les produits sont impliqués dans l'inflammation et l'angiogenèse.

Au tout début de ce travail nous avons mesuré la mortalité cellulaire occasionnée par l'hypoxie intermittente, l'hypoxie chronique ou observée dans les conditions de normoxie. Nous avons constaté que la mortalité cellulaire était moins importante au sein des cellules qui avaient subi des phases d'hypoxie intermittente ou été incubées en hypoxie chronique que pour les cellules incubées en normoxie. Ces résultats confirment que l'hypoxie, qu'elle soit chronique ou intermittente, rend les cellules endothéliales résistantes à la mort. Une hypothèse qui pourrait peut-être expliquer ce phénomène est que l'hypoxie est capable de favoriser la survie cellulaire et/ou d'inhiber l'apoptose en modulant l'expression de gènes de survie. C'est une des fonctions de la réponse adaptative initiée par le facteur HIF-1.

Nous avons donc poursuivi notre étude en caractérisant les effets des incubations en hypoxie intermittente ou en hypoxie chronique sur l'activation de trois facteurs de transcription HIF1, Nrf2 et NF- κ B. Ces facteurs de transcription n'ont pas été choisis de manière aléatoire. HIF1

est connu pour être un régulateur clé de l'hypoxie. Il régule l'expression de plus de 70 gènes impliqués dans la réponse cellulaire adaptative à l'hypoxie.

L'environnement tumoral contient des zones en hypoxie chronique et des zones en hypoxie transitoire. L'hypoxie intermittente comprend des phases d'hypoxie et des phases de réoxygénation. La génération de ROS, est comme nous l'avons montré, caractéristique des phases de réoxygénation. Nrf2 et NF- κ B sont tous les deux connus pour être activés par les ROS mais par des niveaux différents. Tout comme HIF1, NF- κ B stimule également la production de protéines qui promeuvent la survie cellulaire, la dilatation des vaisseaux sanguins et l'angiogenèse. Nrf2 quant à lui contribue à la survie cellulaire face au stress oxydatif en augmentant l'expression d'enzymes antioxydantes.

L'activation de ces facteurs pourrait donc contribuer à la survie des cellules endothéliales au cours de l'hypoxie intermittente, c'est pourquoi nous avons étudié leur activité.

Notre étude a montré que les phases d'hypoxie lors de l'hypoxie intermittente, ainsi que l'hypoxie chronique, augmentent l'activité de HIF1. Cette augmentation est plus marquée en hypoxie chronique qu'en hypoxie intermittente car chacune des phases de réoxygénation entraîne la dégradation de HIF1. L'ensemble des résultats montrent que l'hypoxie même de courte durée entraîne la translocation de HIF1, sa liaison à l'ADN au niveau de site HRE et une augmentation de son activité transcriptionnelle. Cet effet est d'autant plus prononcé au fur et à mesure des cycles d'hypoxie intermittente.

Nous avons également constaté une augmentation de l'expression des gènes cibles de HIF suite à l'hypoxie et à l'hypoxie intermittente. Parmi les gènes cibles de HIF1, nous retrouvons des gènes impliqués dans la viabilité cellulaire et dans l'angiogenèse. Nous pouvons donc conclure que l'activation de HIF1 lors des hypoxies prolongées ou des phases d'hypoxie des hypoxies intermittentes peut contribuer à la survie des cellules endothéliales ainsi qu'à l'angiogenèse. Des molécules agissant sur l'activité transcriptionnelle de HIF1 pourraient donc être efficaces pour bloquer la vascularisation et la prolifération tumorale. HIF1 est donc une cible intéressante pour les thérapies antiangiogéniques.

Ayant démontré une production de ROS lors de l'hypoxie intermittente, nous avons étudié l'activité respective de Nrf2 et de NF- κ B.

Ni l'hypoxie intermittente, ni l'hypoxie chronique ne permettent l'activation de Nrf2, ou sa translocation nucléaire ou sa liaison à l'ADN. Il semblerait même que des cycles d'hypoxie intermittente répétés diminuent l'activité de Nrf2, sa liaison à l'ADN ainsi que l'expression de ses gènes cibles. Nrf2 ne participe donc pas à la détoxification des radicaux libres produits au cours de notre cinétique d'hypoxie intermittente. Il ne s'agit donc pas d'un facteur qui contribue à la survie cellulaire des cellules endothéliales lors de l'hypoxie intermittente. Ceci est vrai dans le cas de notre modèle expérimental mais reste à vérifier pour des réoxygénations de plus longue durée. Des phases de réoxygénations plus longues permettraient peut-être d'activer Nrf2 en engendrant une production plus importante de ROS. Nous avons, pour vérifier cela, réalisé un marquage en immunofluorescence de Nrf2 qui après 2h de réoxygénation sans toutefois observer de translocation nucléaire de Nrf2. Nrf2 est pourtant connu pour être activé par de faibles quantités de ROS, quantités détectées au moins lors de la première phase de réoxygénation. Soit ces quantités restent insuffisantes, soit les techniques que nous avons utilisées ne sont pas assez sensibles pour détecter une activation faible de Nrf2.

Finalement, nous avons également montré que NF- κ B n'était pas activé au cours de l'hypoxie intermittente. Les cycles successifs d'hypoxie intermittente semblaient d'ailleurs plutôt diminuer son activité ainsi que l'expression de ses gènes cibles. Ce facteur ne s'avère donc

pas non plus impliqué dans la survie des cellules endothéliales provoquée par l'hypoxie intermittente. Pour ce facteur de transcription, la quantité de ROS produite lors de 30 minutes de réoxygénation n'est peut-être pas suffisante pour induire son activation. Il pourrait être intéressant de tester l'effet de réoxygénations plus longues sur son activité d'autant plus que ce facteur est connu pour être activé par des quantités intermédiaires de radicaux libres, plus importantes que celles nécessaires à l'activation de Nrf2.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons étudié des variations d'expression de gènes impliqués dans l'inflammation. Nous avons choisi de nous intéresser à l'inflammation parce que les phénotypes activés dans les cellules endothéliales par l'inflammation et par l'angiogénèse se recoupent.

Une première observation intéressante est que l'hypoxie intermittente entraîne une diminution d'expression de gènes impliqués dans l'apoptose. En effet, les résultats obtenus à l'aide des microdamiers ont montré la sous-expression des gènes FADD et TRAF2 suite aux phases d'hypoxie de l'hypoxie intermittente. FADD est connu pour induire l'apoptose (Grimm, Stanger et al. 1996) et TRAF pour médier l'activation de NF- κ B et contrôler la sensibilité des cellules à l'apoptose. Le gène TNFRSF1 quant à lui code pour un récepteur au TNF qui est capable d'initier des événements d'apoptose en interagissant avec d'autres protéines.

La diminution de l'expression de ces trois gènes pourrait donc peut-être se traduire par une diminution de la sensibilité à l'apoptose et expliquer l'augmentation de survie cellulaire que nous avons observée suite à l'hypoxie intermittente.

On constate également que l'hypoxie intermittente entraîne la surexpression de plusieurs gènes impliqués dans l'angiogénèse. En effet, IL15 est une cytokine proinflammatoire capable d'induire l'angiogénèse et impliquée dans la survie cellulaire (Angiolillo, Kanegane et al. 1997). Les analyses par microdamiers ont montré que ce gène était surexprimé lors de phases d'hypoxie et de réoxygénation de l'hypoxie intermittente.

Le BDNF peut quant à lui stimuler l'angiogénèse non seulement en favorisant la croissance des vaisseaux sanguins existants mais aussi en mobilisant et en attirant des cellules souches à l'endroit nécessaire, où elles vont planter et murir (Wang, Hu et al. 2006). Ce gène voit son expression augmenter uniquement lors de l'hypoxie intermittente et pas lors de l'hypoxie chronique.

Tant les résultats obtenus grâce aux microdamiers que ceux obtenus grâce aux cartes microfluidiques ont montré une augmentation de l'expression de F2R tant en hypoxie intermittente que en hypoxie chronique. F2R est un récepteur de la thrombine. L'action angiogénique de la thrombine a été montrée comme étant médiée par l'activation de ce récepteur. L'activation de F2R, aussi appelé PAR-1, promeut la prolifération cellulaire, la migration et la différenciation des cellules endothéliales menant à un effet pro-angiogénique (Yin, Salah et al. 2003).

Par ailleurs, lors des phases de réoxygénation, on observe une surexpression du VEGF. Cette surexpression est encore plus prononcée en hypoxie chronique. Le VEGF est le facteur angiogénique le plus caractéristique. Son expression est augmentée dans les cellules manquant d'oxygène pour initier la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins afin de compenser le déficit en oxygène.

Un autre médiateur positif de l'angiogénèse très bien connu, est surexprimé suite à l'hypoxie intermittente. Il s'agit du bFGF également appelé FGF2. Ce facteur peut promouvoir l'angiogénèse par un effet direct sur les cellules endothéliales en favorisant la prolifération des celles-ci et leur organisation en structures tubulaires. Le bFGF exerce également un puissant effet mitogène et chimiotactique pour les cellules endothéliales et pour les cellules fibroblastiques et musculaires lisses des vaisseaux (Compagni, Wilgenbus et al. 2000).

On constate également une augmentation de l'expression de EPHB2 en hypoxie intermittente. Celui-ci est également connu pour avoir une action proangiogène (Maekawa, Oike et al. 2003).

La thrombomoduline (THBD) est une glycoprotéine qui est exprimée de façon constitutive par l'endothélium. Elle agit comme inhibiteur de la coagulation en formant un complexe avec la thrombine, et l'inactive. La thrombine est connue dans la littérature pour stimuler l'angiogenèse tumorale (Nierodzik and Karparkin 2006). La littérature mentionne également un rôle antitumoral joué par les anticoagulants. La thrombomoduline aurait alors un effet anti-angiogène et anti-tumoral. Cependant, on constate ici que quelle que soit la condition testée, son expression est diminuée ce qui soulignerait donc une tendance pro-angiogène.

Il en va de même pour le gène PPAR alpha. PPAR α est connu comme étant un régulateur négatif de l'inflammation (Kaipainen, Kieran et al. 2007). Une déficience en PPAR α entraîne une augmentation de l'inflammation. Nous savons cependant que les cellules inflammatoires activées favorisent l'angiogenèse, la prolifération des cellules tumorales et les métastases par la production de médiateurs angiogéniques, facteurs de croissance, chémokines et protéases. On constate que suite à l'hypoxie intermittente, l'expression de PPAR α diminue ce qui suppose une augmentation de l'inflammation ce qui favorise l'angiogenèse. On constate également que les phases de réoxygénation de l'hypoxie intermittente entraînent la surexpression du gène TNFRSF11A aussi appelé TRANCE. Ce dernier est connu pour induire l'angiogenèse via l'activation de Src et de la phospholipase C dans les cellules endothéliales (Kim, Kim et al. 2002). Il est donc indirectement impliqué dans l'angiogenèse.

Grâce aux cartes microfluidiques, nous avons constaté que un autre gène, CSF1 était surexprimé suite à l'hypoxie intermittente. Il s'avère qu'il intervient dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Le gène CSF1 également appelé M-CSF promeut la sécrétion de VEGF par les monocytes et favorise ainsi l'angiogenèse (Eubank, Galloway et al. 2003).

L'ensemble de ces résultats montrent que les gènes qui sont surexprimés suite à l'hypoxie intermittente favorisent tous la néoangiogenèse. L'hypoxie intermittente augmente l'expression de gènes proangiogéniques et diminue l'expression de gènes proapoptotiques. Cela nous conforte à penser que suite à l'hypoxie intermittente, les cellules endothéliales acquièrent un phénotype angiogénique. L'hypoxie intermittente paraît également favoriser la survie des cellules endothéliales.

Il faut cependant noter que certains gènes qui pourraient favoriser l'angiogenèse voient leur expression diminuer suite aux cycles d'hypoxie intermittente. C'est notamment le cas des gènes CSF2, CFS3, EPOR, FLT4, ICAM3, IL8, JUN, NRG1, et PDGF. ICAM3 est une molécule d'adhérence qui pourrait jouer un rôle dans les premières étapes de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. EPOR promeut la survie des cellules endothéliales et promeut l'angiogenèse en recrutant des progéniteurs des cellules endothéliales (Kertesz, Wu et al. 2004). Pour ce qui est du gène JUN, certaines études ont suggéré un lien entre l'activation de ce gène et l'angiogenèse tumorale. Une activité angiogénique devrait en effet être ajoutée à la liste de fonctions de JUN (Folkman 2004). Il est également mentionné dans la littérature que NRG1 est capable d'activer les ErbB dans les cellules endothéliales et d'induire ainsi l'angiogenèse. Le gène FLT4 code quant à lui pour un récepteur tyrosine kinase qui régule l'angiogenèse et la vasculogenèse en réponse à la liaison des ligands de la famille du VEGF : VEGF-C et VEGF-D.

PDGF est également impliqué dans l'angiogenèse. Une déficience en PDGF peut conduire à la formation de vaisseaux immatures et anormaux (Chantrain, Henriot et al. 2006).

L'ensemble de ces gènes s'avèrent être réprimés suite à l'incubation en hypoxie intermittente ce qui souligne que via la régulation de l'expression de ces gènes, l'hypoxie intermittente aurait un effet anti-angiogénique.

Comme je l'ai mentionné dans l'introduction, l'angiogenèse est contrôlée par une balance d'inhibiteurs et d'activateurs, produits par les cellules normales ou tumorales. Le basculement vers le phénotype angiogénique implique le basculement de cet équilibre en faveur des facteurs pro-angiogéniques (figure 14). On constate de manière générale suite à l'ensemble des résultats obtenus dans cette deuxième partie, que l'hypoxie intermittente tend à faire pencher la balance en faveur des facteurs pro-angiogéniques même si l'expression de certains gènes proangiogéniques est diminuée dans ces conditions. Les cellules endothéliales vont dès lors acquérir un phénotype angiogénique qui se caractérise par une augmentation de la prolifération et de la migration. On a constaté que l'hypoxie intermittente permet de faire pencher la balance de deux manières : soit en inhibant l'expression de certains facteurs antiangiogéniques (THBD), soit en augmentant l'expression de facteurs proangiogéniques (bFGF). On constate sur les tableaux 6 et 7 que l'hypoxie intermittente, qui comprend des phases d'hypoxie et de réoxygénation augmente l'expression des deux régulateurs clé les mieux connus de l'angiogenèse : le VEGF et le bFGF. L'augmentation de l'expression de 5 autres gènes (BDNF, EPHB2, F2R, IL15, TNFRSF11A) ainsi que la diminution d'expression de deux inhibiteurs de l'angiogenèse renforce cet effet proangiogène. Cependant, nous constatons que la répression suite à l'hypoxie intermittente (hypoxie et réoxygénation) d'une série de gènes tend à défavoriser la croissance des vaisseaux sanguins au sein de la tumeur. Il est donc difficile à ce stade de deviner de quel côté la balance penchera suite à l'hypoxie intermittente.

Parallèlement à cela, nous avons également réalisé une étude de l'expression de gènes dans des cellules soumises à des incubations en hypoxie chronique afin de comparer les effets de l'hypoxie intermittente et de l'hypoxie chronique, bien que les cellules endothéliales ne sont généralement pas touchées *in vivo* dans la tumeur par l'hypoxie chronique. Nous remarquons que l'hypoxie chronique entraîne des variations d'expression de gènes différentes de celles observées suite à l'hypoxie intermittente. Une constatation importante est que le VEGF est plus fortement surexprimé suite à l'hypoxie chronique que suite à l'hypoxie intermittente. Certains gènes varient de la même façon lors de l'hypoxie intermittente et de l'hypoxie chronique. C'est notamment le cas des gènes THBD, RUNX1, FOSL1. Les variations observées pour RUNX1, THBD et le VEGF favorisent l'angiogenèse. Par contre, la plupart des gènes qui s'avéraient être surexprimés suite à l'hypoxie intermittente et proangiogènes, n'apparaissent pas suite à l'hypoxie chronique. Cependant, des augmentations d'expression d'autres gènes impliqués dans l'angiogenèse apparaissent. Le gène IL6 notamment s'avère être surexprimé suite à l'hypoxie chronique et est impliqué indirectement dans l'angiogenèse. IL6 est en effet capable d'induire l'expression du VEGF. Des répressions de gènes qui n'apparaissent pas suite à l'hypoxie intermittente sont également observables. C'est vrai pour le gène CCL2 qui est réprimé en hypoxie chronique. Ce gène également appelé MCP-1 est connu pour induire l'angiogenèse notamment en augmentant l'expression du gène HIF1 α (Hong, Ryu et al. 2005).

D'autres gènes voient leur expression réprimée suite à l'hypoxie chronique : IL1 α , IL1, HBEGF, PGF. Ces gènes sont tous les quatre capables d'induire l'angiogenèse. Cependant, il s'avère que leur expression est réprimée suite à l'hypoxie chronique.

En ce qui concerne l'hypoxie chronique, on remarque donc (tableaux 6 et 7) que l'augmentation prononcée de l'expression du VEGF ainsi que la surexpression de IL6 et F2R entraînent la prolifération et la migration des cellules endothéliales. On constate cependant

que les facteurs proangiogéniques surexprimés sont moins nombreux que suite à l'incubation en hypoxie intermittente. De plus, les facteurs qui jouent en la défaveur de l'angiogenèse de par leur diminution sont assez nombreux.

Tous ces résultats nous laissent penser que l'hypoxie chronique favoriserait peut-être l'angiogenèse mais de manière moins prononcée que l'hypoxie intermittente.

De manière intéressante parmi les gènes dont on retrouve des variations d'expression, on retrouve trois gènes encodant des facteurs de transcription. Il s'agit de PPAR α , IRF2 et RUNX1.

PPAR α voit son expression diminuer en hypoxie intermittente. La littérature rapporte que PPAR α a un effet anti inflammatoire en réprimant l'expression d'une série de gènes proinflammatoires (Kaipainen, Kieran et al. 2007). Puisque l'hypoxie intermittente diminue son expression, cette répression pourrait être levée et l'expression des gènes augmentée. Ceci reste à être vérifié expérimentalement dans notre modèle.

IRF2 est quant à lui induit en hypoxie chronique. Il est impliqué dans la régulation de l'expression de certains gènes inflammatoires comme CCL2 (Buttmann, Berberich-Siebelt et al. 2007) et VCAM1 (Jesse, LaChance et al. 1998) mais également dans l'expression de gènes qui favorisent la prolifération cellulaire (Masumi, Yamakawa et al. 2003).

RUNX1 est un facteur de transcription impliqué dans la différenciation des cellules hématopoïétiques en hémangioblastes (Lacaud, Gore et al. 2002). Il est impliqué dans la vasculogenèse (Baron 2001) mais également dans l'angiogenèse (Iwatsuki, Tanaka et al. 2005) au cours du développement. Cependant, il n'a jamais été décrit comme étant impliqué dans l'angiogenèse tumorale mais les résultats obtenus au cours de ce travail semblent le suggérer. C'est un résultat intéressant qui nécessite d'être approfondi.

L'ensemble de ces résultats suggère que les variations d'expression de ces trois facteurs de transcription pourraient favoriser un phénotype angiogénique des cellules endothéliales. Des expériences supplémentaires doivent cependant être réalisées afin de vérifier si ces variations d'expression se répercutent sur leur activité et d'investiguer les effets que ces variations entraînent sur le phénotype des cellules endothéliales.

En conclusion, nous avons montré dans ce travail que l'hypoxie intermittente joue un rôle différent de l'hypoxie chronique. Elle favorise la survie des cellules endothéliales et semble entraîner un changement phénotypique de celles-ci vers un phénotype angiogénique comme observé par Martinive et al (2007). Les variations d'expression génique observées dans ce travail peuvent expliquer ce changement.

Bibliographie

- Angiolillo, A. L., H. Kanegane, et al. (1997). "Interleukin-15 promotes angiogenesis in vivo." Biochem Biophys Res Commun 233(1): 231-7.
- Baron, M. H. (2001). "Molecular regulation of embryonic hematopoiesis and vascular development: a novel pathway." J Hematother Stem Cell Res 10(5): 587-94.
- Brahimi-Horn, C. and J. Pouyssegur (2006). "The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion." Bull Cancer 93(8): E73-80.
- Brown, J. M. (1990). "Tumor hypoxia, drug resistance, and metastases." J Natl Cancer Inst 82(5): 338-9.
- Brown, J. M. and A. J. Giaccia (1998). "The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy." Cancer Res 58(7): 1408-16.
- Buttmann, M., F. Berberich-Siebelt, et al. (2007). "Interferon-beta is a potent inducer of interferon regulatory factor-1/2-dependent IP-10/CXCL10 expression in primary human endothelial cells." J Vasc Res 44(1): 51-60.
- Cecarini, V., J. Gee, et al. (2007). "Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism." Biochim Biophys Acta 1773(2): 93-104.
- Chantrain, C. F., P. Henriet, et al. (2006). "Mechanisms of pericyte recruitment in tumour angiogenesis: a new role for metalloproteinases." Eur J Cancer 42(3): 310-8.
- Compagni, A., P. Wilgenbus, et al. (2000). "Fibroblast growth factors are required for efficient tumor angiogenesis." Cancer Res 60(24): 7163-9.
- Cross, M. J., J. Dixelius, et al. (2003). "VEGF-receptor signal transduction." Trends Biochem Sci 28(9): 488-94.
- Edgell, C. J., C. C. McDonald, et al. (1983). "Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization." Proc Natl Acad Sci U S A 80(12): 3734-7.
- Eggler, A. L., G. Liu, et al. (2005). "Modifying specific cysteines of the electrophile-sensing human Keap1 protein is insufficient to disrupt binding to the Nrf2 domain Neh2." Proc Natl Acad Sci U S A 102(29): 10070-5.
- Eubank, T. D., M. Galloway, et al. (2003). "M-CSF induces vascular endothelial growth factor production and angiogenic activity from human monocytes." J Immunol 171(5): 2637-43.
- Folkman, J. (2004). "Angiogenesis and c-Jun." J Natl Cancer Inst 96(9): 644.
- Giaccia, A. J., M. C. Simon, et al. (2004). "The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease." Genes Dev 18(18): 2183-94.
- Gloire, G., S. Legrand-Poels, et al. (2006). "NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later." Biochem Pharmacol 72(11): 1493-505.
- Grimm, S., B. Z. Stanger, et al. (1996). "RIP and FADD: two "death domain"-containing proteins can induce apoptosis by convergent, but dissociable, pathways." Proc Natl Acad Sci U S A 93(20): 10923-7.
- Gupta, M. K. and R. Y. Qin (2003). "Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis." World J Gastroenterol 9(6): 1144-55.
- Hayden, M. S. and S. Ghosh (2004). "Signaling to NF-kappaB." Genes Dev 18(18): 2195-224.
- Hockel, M. and P. Vaupel (2001). "Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects." J Natl Cancer Inst 93(4): 266-76.
- Hoeben, A., B. Landuyt, et al. (2004). "Vascular endothelial growth factor and angiogenesis." Pharmacol Rev 56(4): 549-80.

- Hong, K. H., J. Ryu, et al. (2005). "Monocyte chemoattractant protein-1-induced angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor-A." Blood 105(4): 1405-7.
- Huang, H. C., T. Nguyen, et al. (2002). "Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription." J Biol Chem 277(45): 42769-74.
- Itoh, K., I. Tong, et al. (2004). "Molecular mechanism activating nrf2-keap1 pathway in régulation of adaptive response to electrophiles." Free radical Biology and Medicine 36(10): 1208-1213.
- Iwatsuki, K., K. Tanaka, et al. (2005). "Runx1 promotes angiogenesis by downregulation of insulin-like growth factor-binding protein-3." Oncogene 24(7): 1129-37.
- Jesse, T. L., R. LaChance, et al. (1998). "Interferon regulatory factor-2 is a transcriptional activator in muscle where It regulates expression of vascular cell adhesion molecule-1." J Cell Biol 140(5): 1265-76.
- Kaipainen, A., M. W. Kieran, et al. (2007). "PPARalpha Deficiency in Inflammatory Cells Suppresses Tumor Growth." PLoS ONE 2: e260.
- Kalluri, R. (2003). "Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis." Nat Rev Cancer 3(6): 422-33.
- Kertesz, N., J. Wu, et al. (2004). "The role of erythropoietin in regulating angiogenesis." Dev Biol 276(1): 101-10.
- Kim, Y. M., Y. M. Kim, et al. (2002). "TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE) induces angiogenesis through the activation of Src and phospholipase C (PLC) in human endothelial cells." J Biol Chem 277(9): 6799-805.
- Lacaud, G., L. Gore, et al. (2002). "Runx1 is essential for hematopoietic commitment at the hemangioblast stage of development in vitro." Blood 100(2): 458-66.
- Lee, J. W., S. H. Bae, et al. (2004). "Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions." Exp Mol Med 36(1): 1-12.
- Leonard, M. O., N. E. Kieran, et al. (2006). "Reoxygenation-specific activation of the antioxidant transcription factor Nrf2 mediates cytoprotective gene expression in ischemia-reperfusion injury." Faseb J.
- Li, C. and R. M. Jackson (2002). "Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury." Am J Physiol Cell Physiol 282(2): C227-41.
- Li, N. and M. Karin (1999). "Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress?" Faseb J 13(10): 1137-43.
- Lyakhovich, V. V., V. A. Vavilin, et al. (2006). "Active defense under oxidative stress. The antioxidant responsive element." Biochemistry (Mosc) 71(9): 962-74.
- Maekawa, H., Y. Oike, et al. (2003). "Ephrin-B2 induces migration of endothelial cells through the phosphatidylinositol-3 kinase pathway and promotes angiogenesis in adult vasculature." Arterioscler Thromb Vasc Biol 23(11): 2008-14.
- Martine, P., F. Defresne, et al. (2006). "Preconditioning of the tumor vasculature and tumor cells by intermittent hypoxia: implications for anticancer therapies." Cancer Res 66(24): 11736-44.
- Masumi, A., Y. Yamakawa, et al. (2003). "Interferon regulatory factor-2 regulates cell growth through its acetylation." J Biol Chem 278(28): 25401-7.
- Matsumoto, T. and H. Mugishima (2006). "Signal transduction via vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors and their roles in atherogenesis." J Atheroscler Thromb 13(3): 130-5.
- Maxwell, P. H. (2004). "HIF-1's relationship to oxygen: simple yet sophisticated." Cell Cycle 3(2): 156-9.
- May, M. J. and S. Ghosh (1998). "Signal transduction through NF-kappa B." Immunol Today 19(2): 80-8.

- Nierodzik, M. L. and S. Karpatkin (2006). "Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype." Cancer Cell 10(5): 355-62.
- Olsson, A. K., A. Dimberg, et al. (2006). "VEGF receptor signalling - in control of vascular function." Nat Rev Mol Cell Biol 7(5): 359-71.
- Papetti, M. and I. M. Herman (2002). "Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis." Am J Physiol Cell Physiol 282(5): C947-70.
- Perkins, N. D. (2007). "Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function." Nat Rev Mol Cell Biol 8(1): 49-62.
- Polverini, P. J. (1995). "The pathophysiology of angiogenesis." Crit Rev Oral Biol Med 6(3): 230-47.
- Rofstad, E. K., K. Galappathi, et al. (2007). "Fluctuating and diffusion-limited hypoxia in hypoxia-induced metastasis." Clin Cancer Res 13(7): 1971-8.
- Ruas, J. L. and L. Poellinger (2005). "Hypoxia-dependent activation of HIF into a transcriptional regulator." Semin Cell Dev Biol 16(4-5): 514-22.
- Valko, M., D. Leibfritz, et al. (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." Int J Biochem Cell Biol 39(1): 44-84.
- Wakabayashi, N., A. T. Dinkova-Kostova, et al. (2004). "Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers." Proc Natl Acad Sci U S A 101(7): 2040-5.
- Wang, Y. D., Y. Hu, et al. (2006). "[Involvement of AKT/eNOS in brain derived neurotrophic factor-induced angiogenesis]." Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi 27(8): 529-33.
- Wenger, R. H. (2002). "Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression." Faseb J 16(10): 1151-62.
- Xiao, W. (2004). "Advances in NF-kappaB signaling transduction and transcription." Cell Mol Immunol 1(6): 425-35.
- Yin, Y. J., Z. Salah, et al. (2003). "Oncogenic transformation induces tumor angiogenesis: a role for PAR1 activation." Faseb J 17(2): 163-74.
- Zagorska, A. and J. Dulak (2004). "HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing." Acta Biochim Pol 51(3): 563-85.
- Zhang, G. and S. Ghosh (2001). "Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity." J Clin Invest 107(1): 13-9.

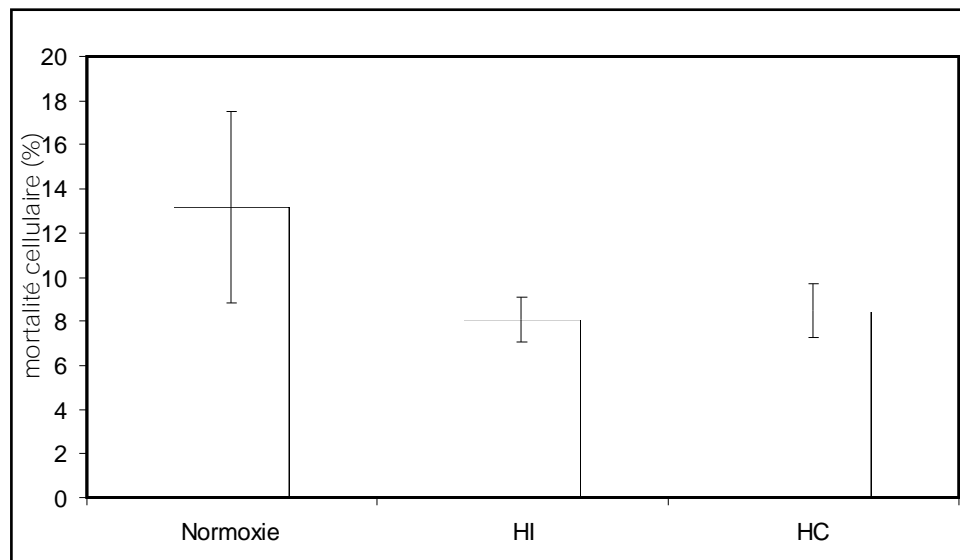


Figure 1: Effet de l'hypoxie intermittente, de l'hypoxie chronique et de la normoxie sur la viabilité cellulaire. Ensemencées à une densité de 50000 cellules par puits, les cellules EAhy926 ont été incubées 6h en hypoxie intermittente (HI) ou en hypoxie chronique (HC) ou en normoxie dans du milieu CO₂ indépendant. Après marquage au bromure d'éthidium/acridine orange, les cellules colorées en vert ou en rouge ont été dénombrées. Les résultats sont exprimés en pourcentage de mortalité en tant que moyennes \pm 1 écart-type (n=3).

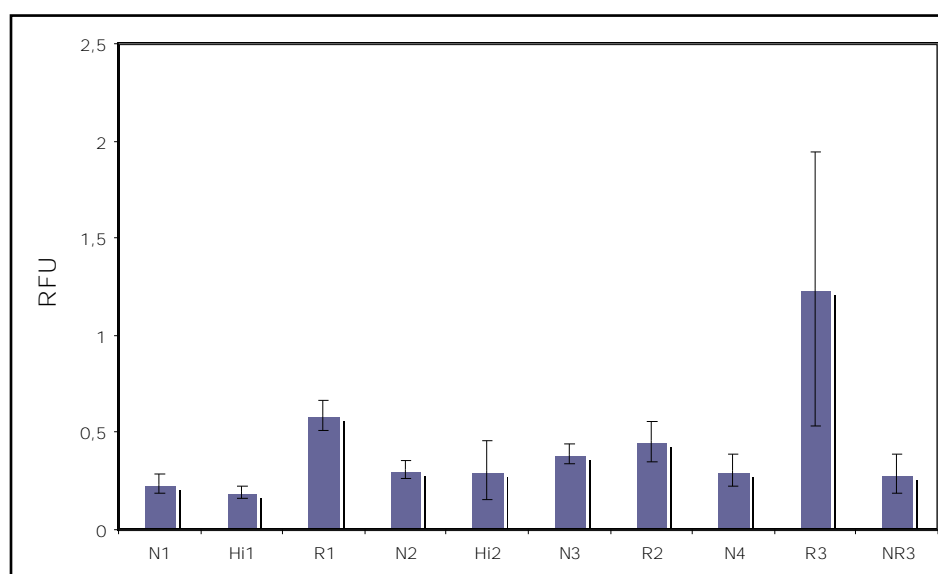


Figure 2 : Dosage des radicaux libres produits au cours de deux cycles d'hypoxie intermittente. Les cellules EAhy926 ont étéensemencées à une densité de 50000 cellules par puits et incubées au début de la cinétique avec la sonde H₂DCF-DA diluée dans du milieu CO₂ indépendant. Les cellules ont ensuite subi un ou deux cycles d'hypoxie intermittente ou de normoxie et une mesure de la fluorescence a été effectuée après chaque étape de la cinétique. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm un écart-type (n= 3). N1 : Normoxie 1h (cycle 1) ; Hi1 : Hypoxie intermittente 1h (cycle 1) ; R1 : réoxygénation 30 minutes (cycle 1) ; N2 : Normoxie 1h30 ; Hi2 : Hypoxie intermittente 1h (cycle 2) ; N3 : Normoxie 2h30 ; R2 : Réoxygénation 30 minutes (cycle 2) ; N4 : Normoxie 3h ; R3 : réoxygénation 1h (cycle 2) ; NR3 : Normoxie 3h30.

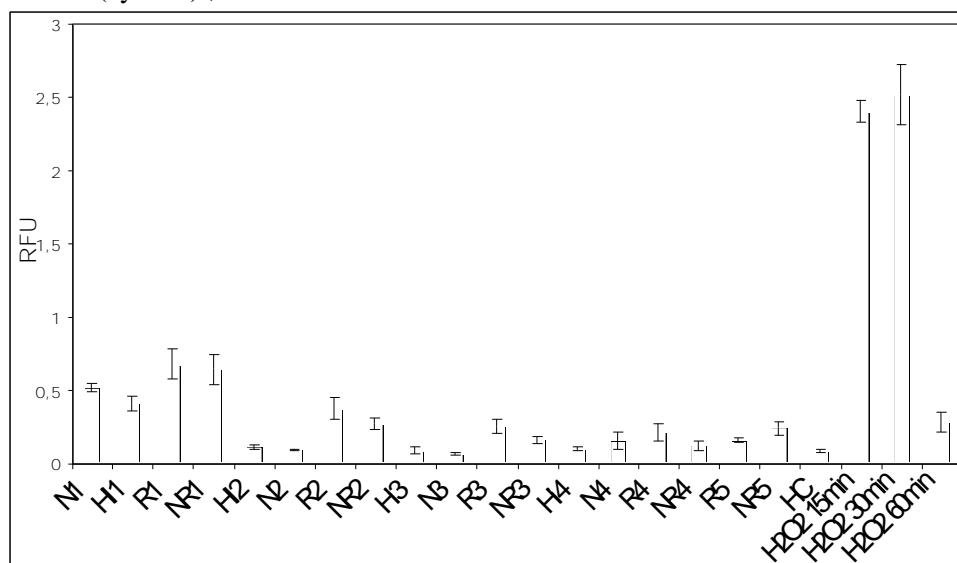


Figure 3 : Dosage des radicaux libres produits au cours de 4 cycles d'hypoxie intermittente ainsi qu'en hypoxie chronique. Les cellules EAhy926 ont étéensemencées à une densité de 50000 cellules par puits et incubées au début de la cinétique avec la sonde H₂DCF-DA diluée dans du milieu CO₂ indépendant. Les cellules ont ensuite subi quatre cycles d'hypoxie intermittente ou 6h d'hypoxie chronique ou de normoxie et une mesure de la fluorescence a été effectuée après chaque étape de la cinétique. Les résultats sont exprimés en moyennes \pm un écart-type (n= 4). N1 : Normoxie 1h (cycle 1) ; Hi1 : Hypoxie intermittente 1h (cycle 1) ; R1 : réoxygénation 30 minutes (cycles 1) ; NR1 : Normoxie 1h30 ; Hi2 : Hypoxie intermittente 1h (cycle 2) ; N2 : Normoxie 2h30 ; R2 : Réoxygénation 30 minutes (cycle 2) ; NR2 : Normoxie 3h ; R3 : réoxygénation 1h (cycle 3) ; NR3 : Normoxie 3h30 ; Hi4 : Hypoxie intermittente 1h (cycle 4) ; N4 : Normoxie 4h30 ; R4 : Réoxygénation 30 minutes (cycle 4) ; NR4 : Normoxie 5h ; R5 : Réoxygénation 1h (cycle 4) ; NR5 : Normoxie 5h30 ; HC : Hypoxie chronique 6h ; H₂O₂ : contrôle positif.

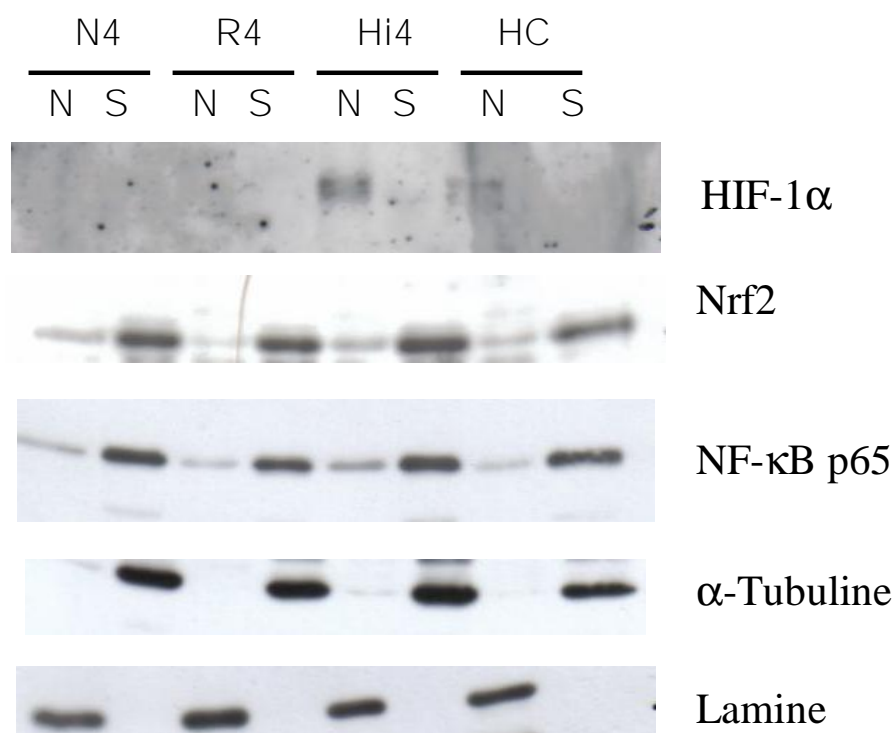
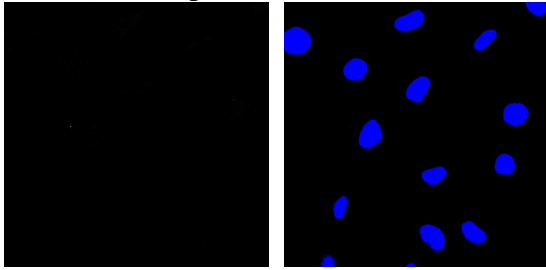


Figure 4: Effet de l'hypoxie intermittente sur l'abondance et la localisation subcellulaire de HIF-1α, Nrf2 et NF-κB.

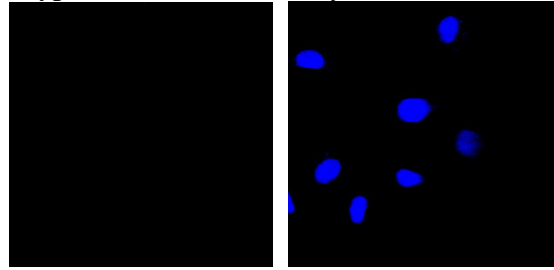
Les cellules EAhy926 ont été incubées 6h en normoxie ou en hypoxie intermittente ou en hypoxie chronique. Des fractions nucléaires (N) et cytoplasmiques (S) ont été obtenues grâce à une extraction par centrifugation différentielle. Les protéines de chaque échantillon ont ensuite été séparées par électrophorèse selon leur poids moléculaire. Une fois transférées sur la membrane, les protéines HIF-1α, Nrf2 ou NF-κB ont été révélées à l'aide d'un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt. Nous avons également réalisé un contrôle de charge pour les fractions nucléaires et un contrôle de charge pour les fractions cytoplasmiques. Il s'agit respectivement de la lamine et de l'α-tubuline.

N4 : normoxie 6h ; R4 : réoxygénation après 4 cycles d'hypoxie intermittente ; Hi4 : hypoxie intermittente 6h ; HC : hypoxie chronique.

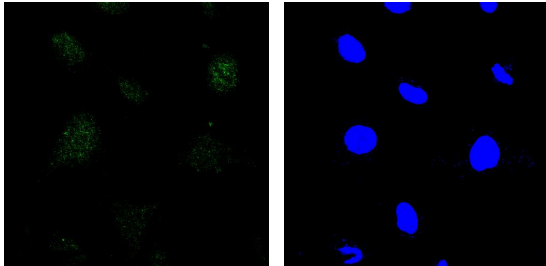
Normoxie temps 0



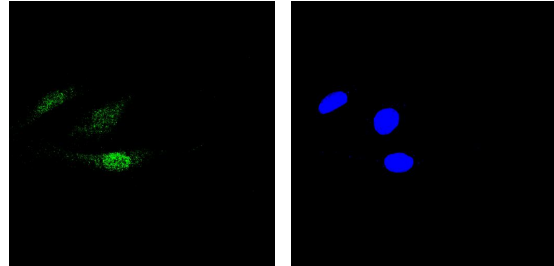
Hypoxie intermittente (cycle1)



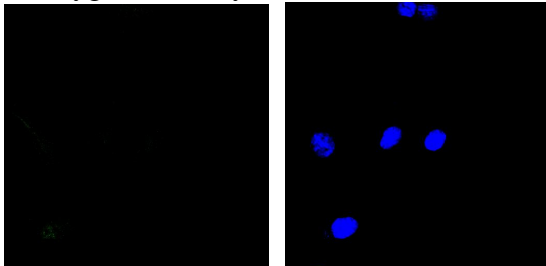
Réoxygénation (cycle 1)



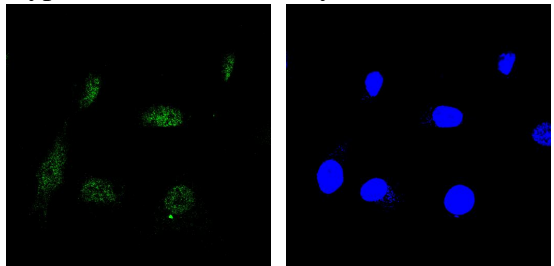
Hypoxie intermittente (cycle 2)



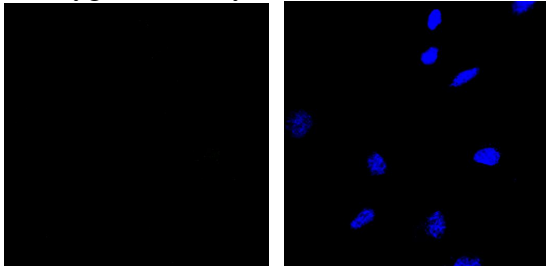
Réoxygénation (cycle 2)



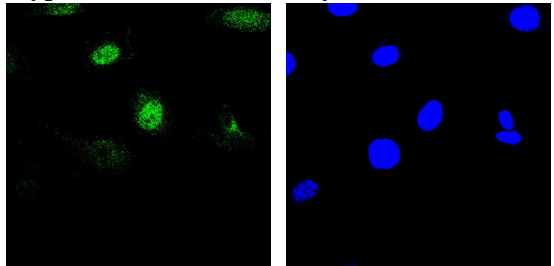
Hypoxie intermittente (cycle 3)



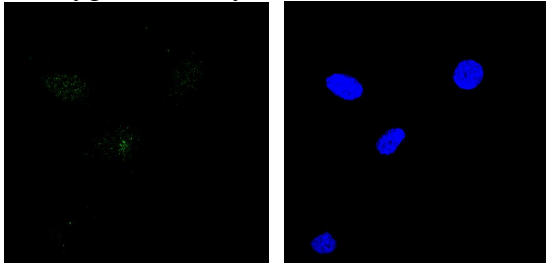
Réoxygénation (cycle 3)



Hypoxie intermittente (cycle 4)



Réoxygénation (cycle 4)



Hypoxie chronique (6h)

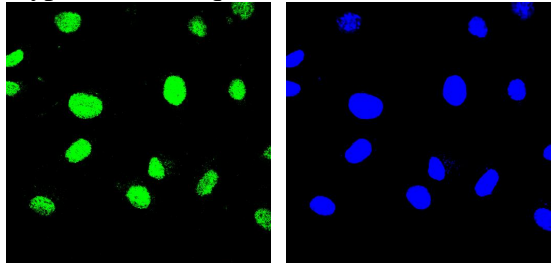
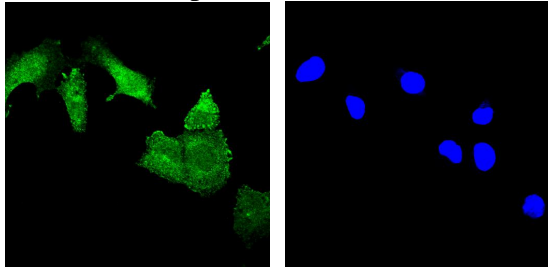
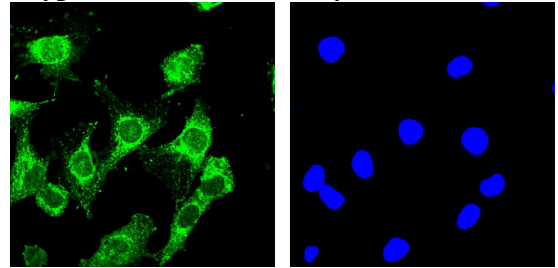


Figure 5: Effet de l'hypoxie intermittente et l'hypoxie chronique sur la localisation subcellulaire de HIF-1 α . Les cellules EAhy926 ont étéensemencées à une densité de 35000 cellules par puits. Elles ont ensuite été incubées dans du milieu CO2 indépendant pendant 6h en hypoxie intermittente ou en hypoxie chronique ou en normoxie. Après fixation et perméabilisation, HIF-1 α a été détecté grâce à un anticorps spécifique. La protéine d'intérêt est marquée en vert et les noyaux sont marqués à l'aide de TOPRO (bleu). Les cellules sont visualisées grâce à un microscope confocal.

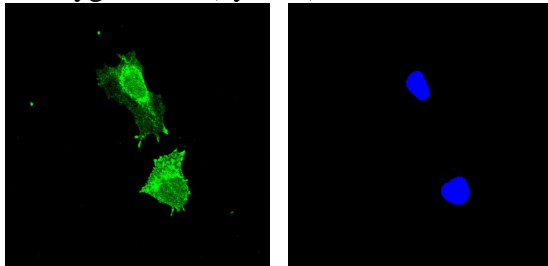
Normoxie temps 0



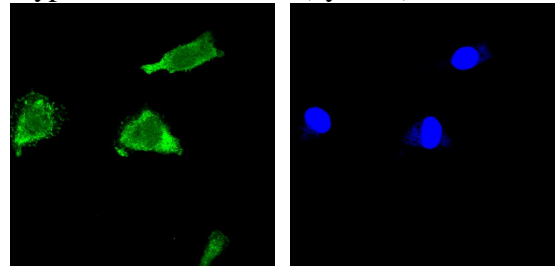
Hypoxie intermittente (cycle1)



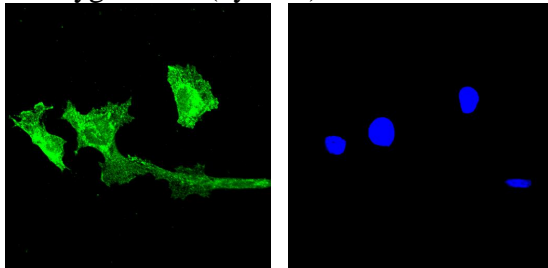
Réoxygénation (cycle 1)



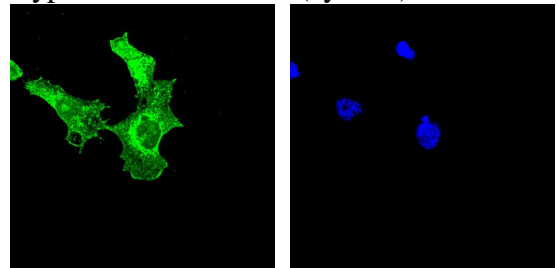
Hypoxie intermittente (cycle 2)



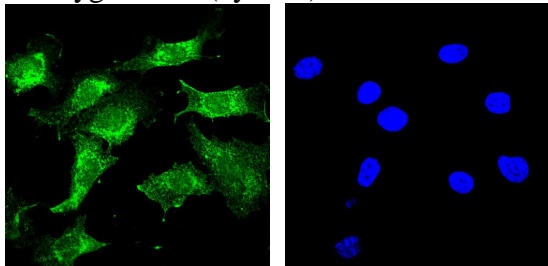
Réoxygénation (cycle 2)



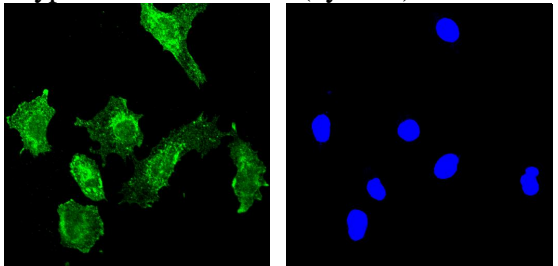
Hypoxie intermittente (cycle 3)



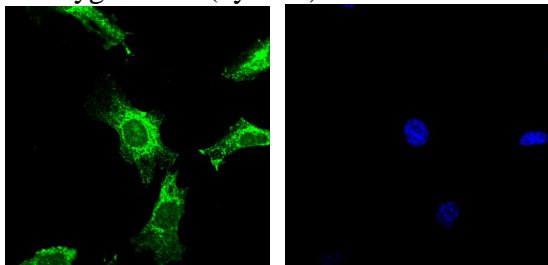
Réoxygénation (cycle 3)



Hypoxie intermittente (cycle 4)



Réoxygénation (cycle 4)



Hypoxie chronique (6h)

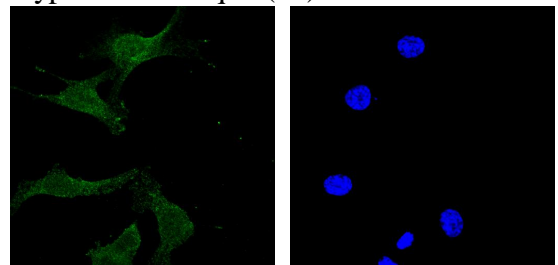
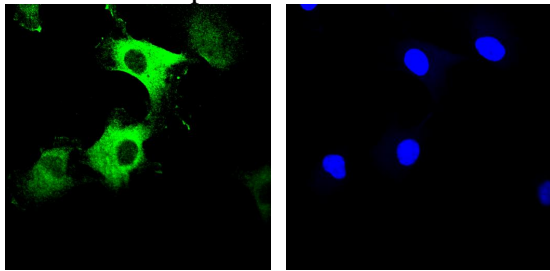
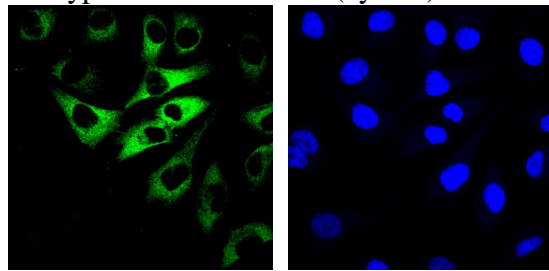


Figure 6 : Effet de l'hypoxie intermittente et l'hypoxie chronique sur la localisation subcellulaire de Nrf2. Les cellules EAhy926 ont étéensemencées à une densité de 35000 cellules par puits. Elles ont ensuite été incubées dans du milieu CO2 indépendant pendant 6h en hypoxie intermittente ou en hypoxie chronique ou en normoxie. Après fixation et perméabilisation, Nrf2 a été détecté grâce à un anticorps spécifique. La protéine d'intérêt est marquée en vert et les noyaux sont marqués à l'aide de TOPRO (bleu).Les cellules sont visualisées grâce à un microscope confocal.

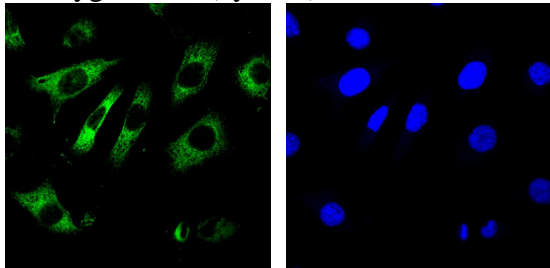
Normoxie temps 0



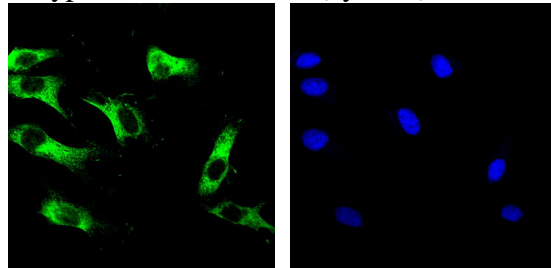
Hypoxie intermittente (cycle1)



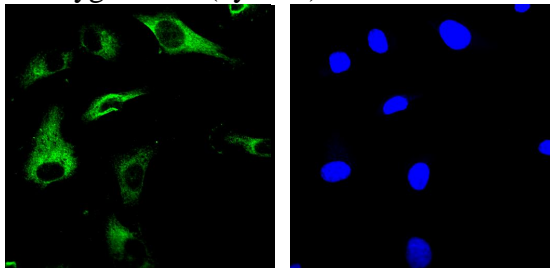
Réoxygénation (cycle 1)



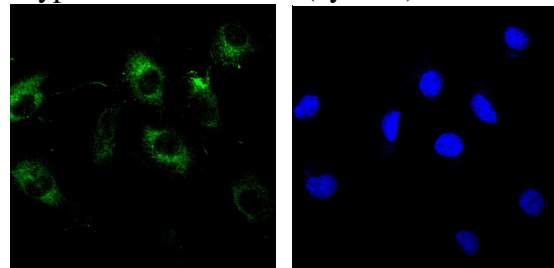
Hypoxie intermittente (cycle 2)



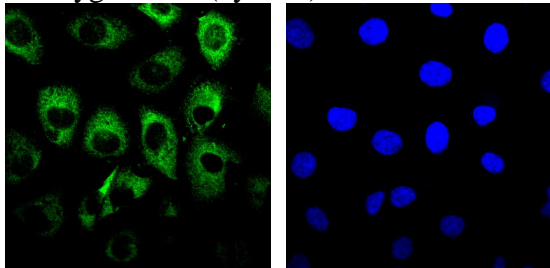
Réoxygénation (cycle 2)



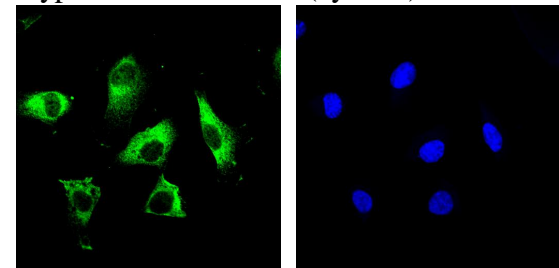
Hypoxie intermittente (cycle 3)



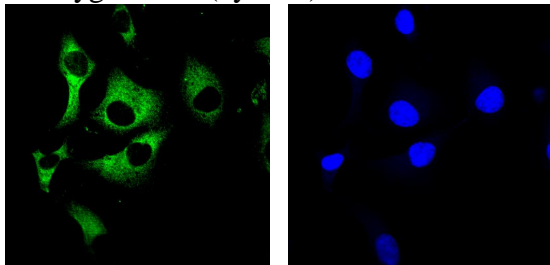
Réoxygénation (cycle 3)



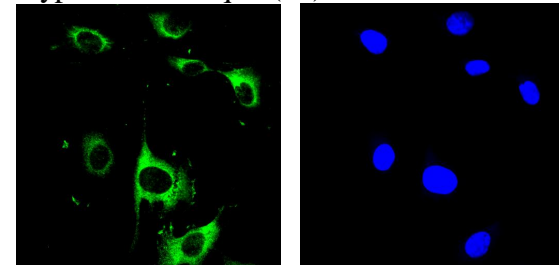
Hypoxie intermittente (cycle 4)



Réoxygénation (cycle 4)



Hypoxie chronique (6h)



Normoxie + TNF α

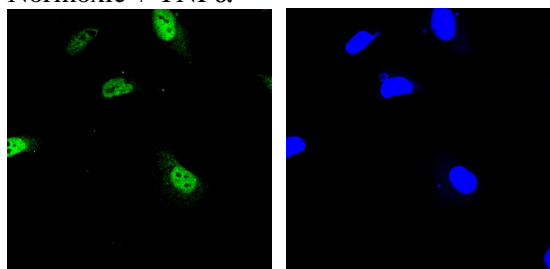
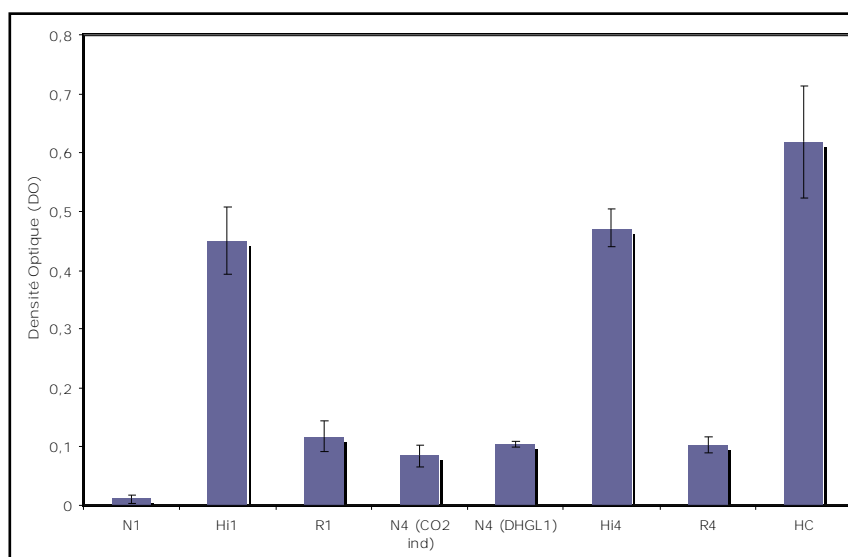
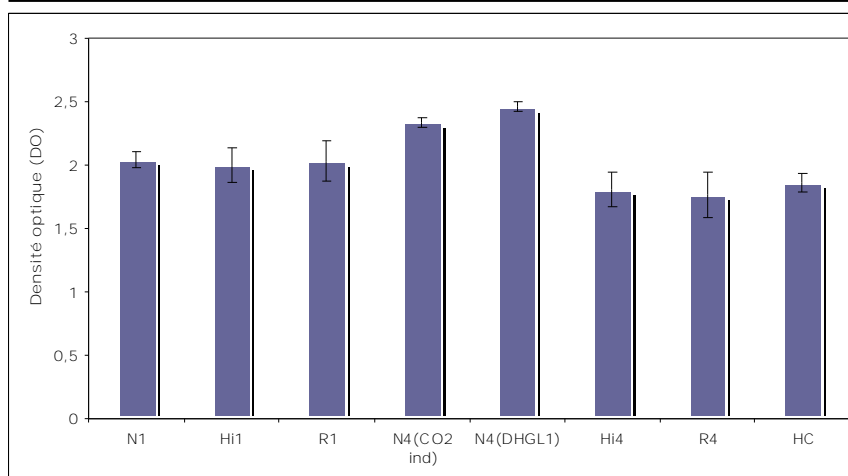


Figure 7 : Effet de l'hypoxie intermittente et l'hypoxie chronique sur la localisation subcellulaire de NF- κ B. Les cellules EAhy926 ont étéensemencées à une densité de 35000 cellules par puits. Elles ont ensuite été incubées dans du milieu CO₂ indépendant pendant 6h en hypoxie intermittente ou en hypoxie chronique ou en normoxie. Après fixation et perméabilisation, la sous-unité p65 de NF- κ B a été détectée grâce à un anticorps spécifique. La protéine d'intérêt est marquée en vert et les noyaux sont marqués à l'aide de TOPRO (bleu). Les cellules sont visualisées grâce à un microscope confocal. Un contrôle positif a aussi été réalisé. Il s'agit d'une incubation de 6 heures en présence de TNF α à une concentration de 10 ng/ml.

HIF1



Nrf2



NF-κB

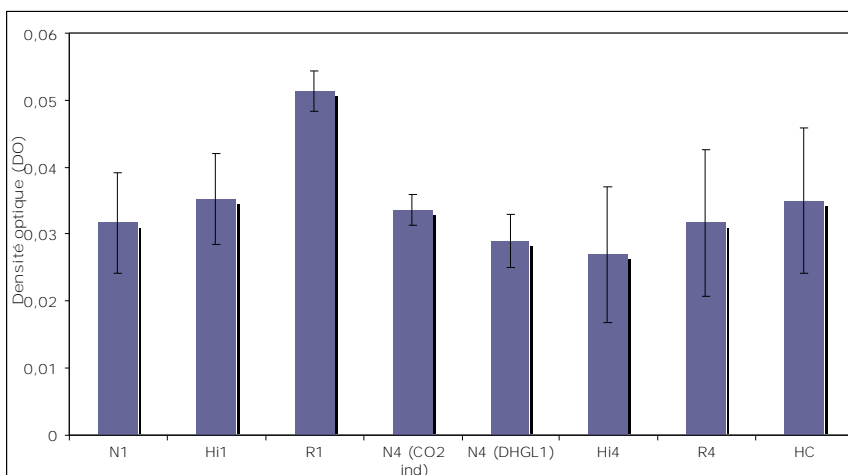
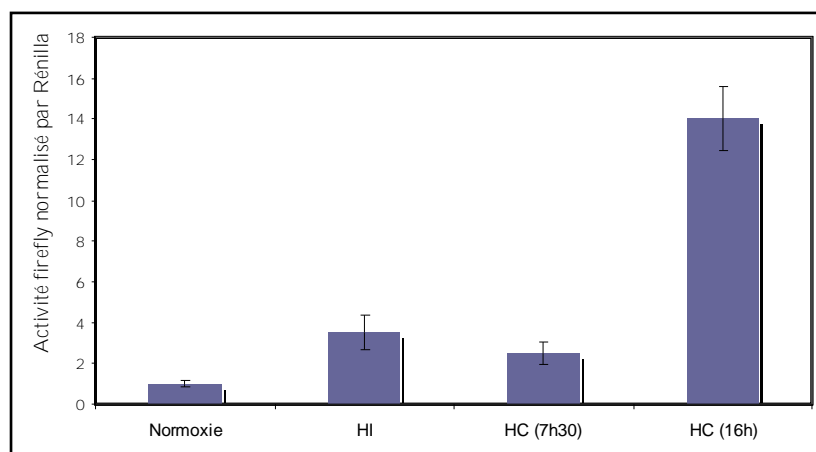
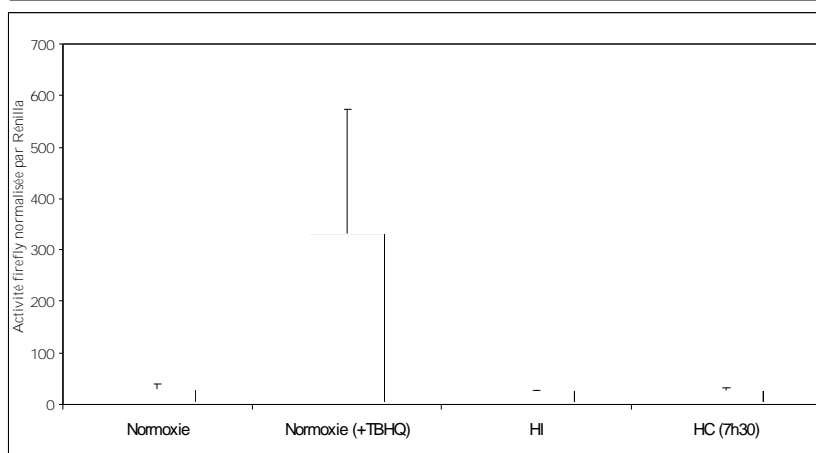


Figure 8 : Etude de l'activité de liaison à l'ADN des facteurs de transcription HIF-1, Nrf2 et NF-κB (sous-unité p65). Les cellules ont été incubées 6h en hypoxie intermittente, hypoxie chronique ou normoxie. Ensuite, une extraction nucléaire a été réalisée. En ce qui concerne l'hypoxie intermittente, les cellules ont été extraites après chaque étape du premier et quatrième cycle. Les résultats sont exprimés en tant que moyennes \pm un écart-type (n= 3). N1 : Normoxie (cycle 1) ; Hi1 : Hypoxie intermittente 1h (cycle 1); R1 : Réoxygénation 30 minutes (cycle 1) ; N4 (CO₂ ind): Normoxie (cycle 4) cellules incubées dans du milieu CO₂ indépendant ; N4 (DHG) : Normoxie (cycle 4) cellules incubées dans du milieu DHG-L1 et placées dans l'étuve ; Hi4 : Hypoxie intermittente 1h (cycle 4); R4 : Réoxygénation 30 minutes (cycle 4) ; HC : Hypoxie chronique.

HIF1



Nrf2



NF-κB

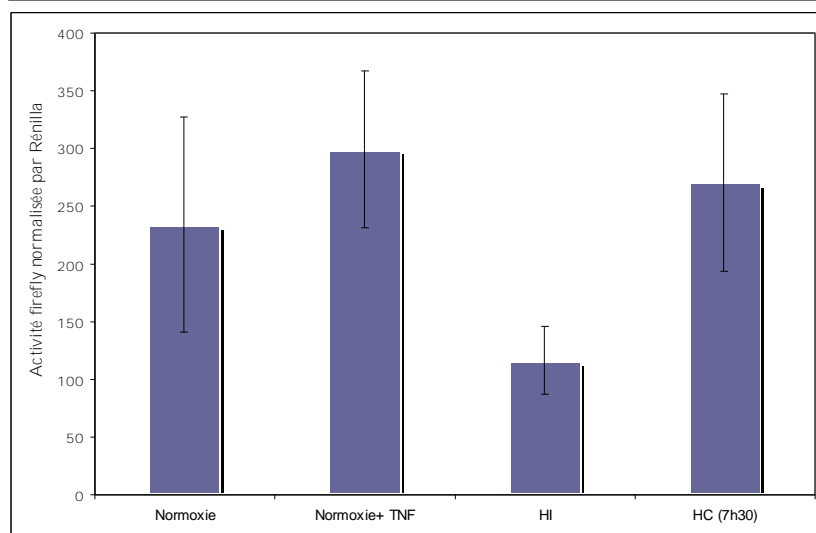


Figure 9 : Effet de l'hypoxie intermittente (HI) et de l'hypoxie chronique (HC) 7h30 et 16h sur l'activité transcriptionnelle de HIF1, Nrf2 et NF-κB. Les cellules EAhy926 sont transfectées avec deux plasmides, le premier contenant le gène codant pour la luciférase sous le contrôle d'un promoteur comportant soit le site HRE reconnu par HIF1, soit le site ARE reconnu par Nrf2, soit le site κB reconnu par NF-κB. Le deuxième contient le gène codant pour Rénilla et sert à la normalisation. Une fois la transfection terminée, les cellules sont incubées en hypoxie intermittente ou en hypoxie chronique pendant 7h30 ou en hypoxie chronique durant 16h. Pour Nrf2 et NF-κB, des contrôles positifs ont été effectués. Il s'agit respectivement d'une incubation en présence de TBHQ à une concentration de 50 μM ou d'une incubation en présence de TNFα à une concentration de 10 ng/ml. Les résultats sont exprimés en tant que moyennes ± un écart-type (n= 3). Pour le graphe de Nrf2, les résultats sont exprimés en tant que moyennes ± un écart-type (n= 4).

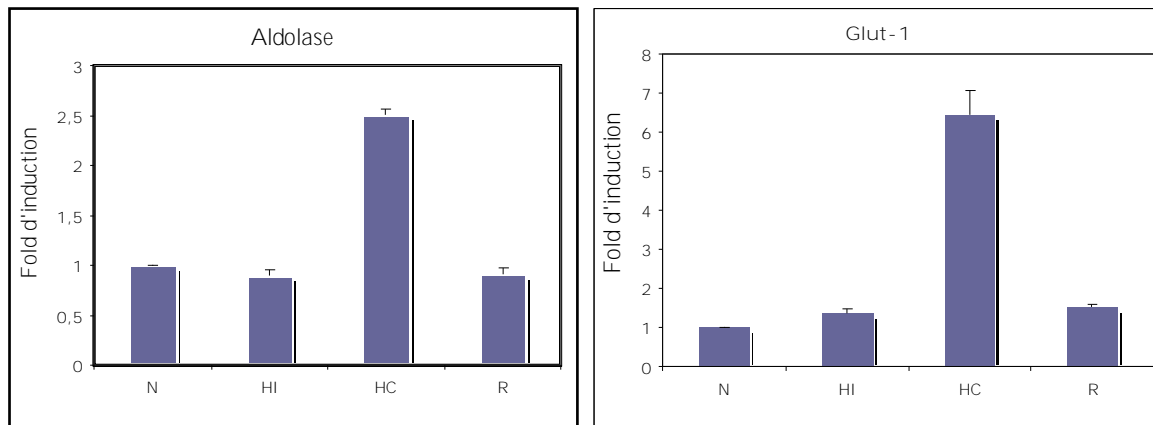


Figure 10 : Effet de l'hypoxie intermittente et de l'hypoxie chronique sur l'expression des gènes Glut1 et aldolase, deux gènes cibles de HIF1, mesurée par PCR en temps réel. Les cellules ont été incubées en 7h30 en hypoxie intermittente (HI), en hypoxie chronique (HC) ou en normoxie (N). Une extraction d'ARN a ensuite été réalisée. Pour ce qui est de l'hypoxie intermittente, une extraction fut effectuée après la dernière hypoxie ainsi qu'après la dernière réoxygénation (1h). L'ARNm a été rétrotranscrit en ADNc. Ce dernier a été amplifié par PCR en temps réel grâce à des amorces spécifiques de l'ARNm d'intérêt. Les résultats sont exprimés en tant que moyennes \pm un écart-type (n= 3).

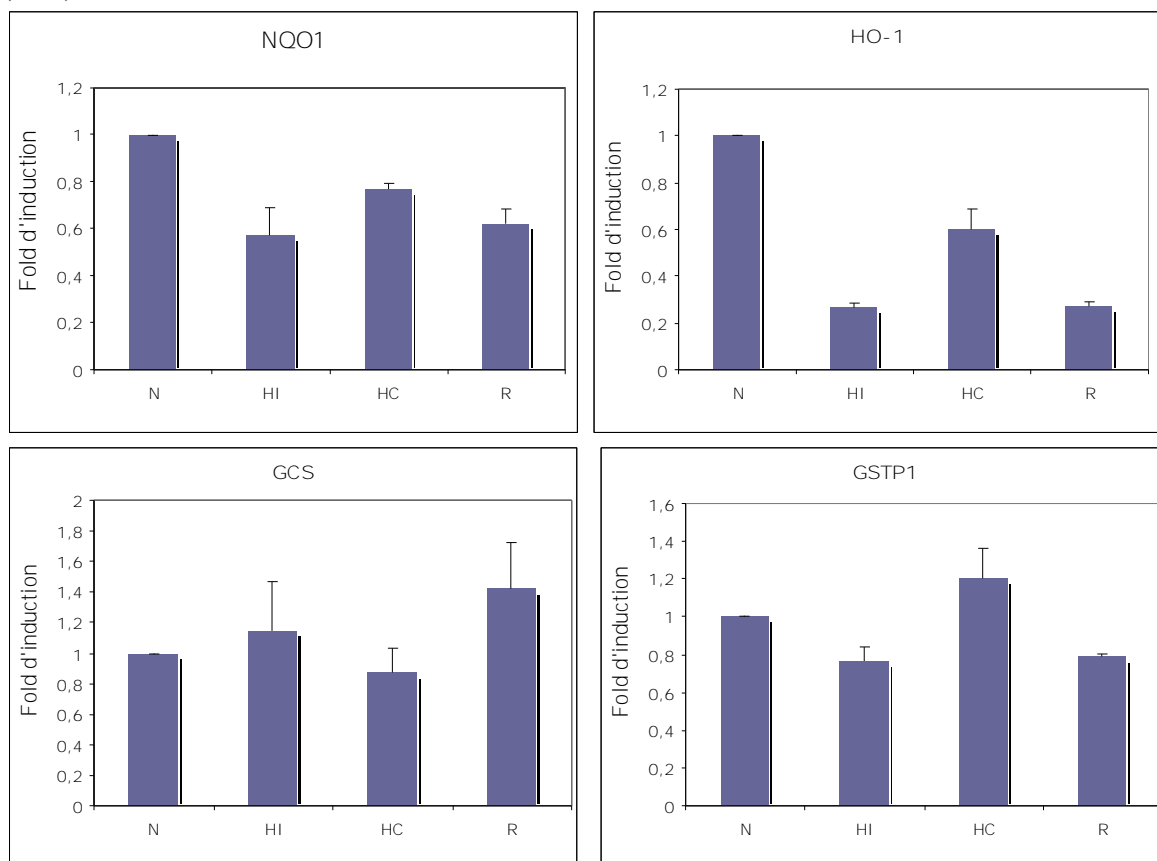


Figure 11 : Effet de l'hypoxie intermittente et de l'hypoxie chronique sur l'expression des gènes NQO1, HO-1, GCS, GSTP1, quatre gènes cibles de Nrf2, mesurée par PCR en temps réel. Les cellules ont été incubées en 7h30 en hypoxie intermittente (HI), en hypoxie chronique (HC) ou en normoxie (N). Une extraction d'ARN a ensuite été réalisée. Pour ce qui est de l'hypoxie intermittente, une extraction fut effectuée après la dernière hypoxie ainsi qu'après la dernière réoxygénation (1h). L'ARNm a été rétrotranscrit en ADNc. Ce dernier a été amplifié par PCR en temps réel grâce à des amorces spécifiques de l'ARNm d'intérêt. Les résultats sont exprimés en tant que moyennes \pm un écart-type (n= 3).

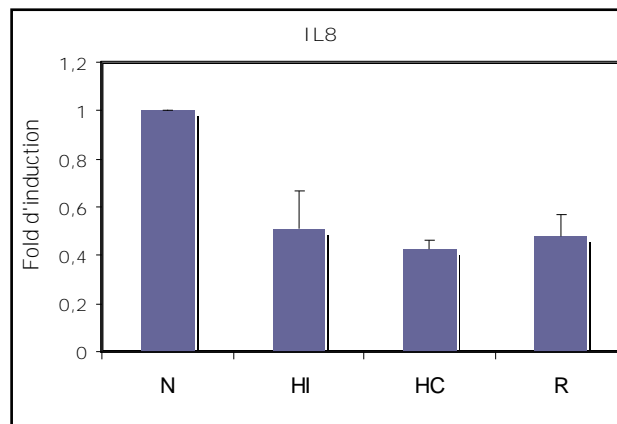


Figure 12 : Effet de l'hypoxie intermittente et de l'hypoxie chronique sur l'expression du gène IL8, un gène cible de NF- κ B, mesurée par PCR en temps réel. Les cellules ont été incubées en 7h30 en hypoxie intermittente (HI), en hypoxie chronique (HC) ou en normoxie (N). Une extraction d'ARN a ensuite été réalisée. Pour ce qui est de l'hypoxie intermittente, une extraction fut effectuée après la dernière hypoxie ainsi qu'après la dernière réoxygénation (1h). L'ARNm a été rétrotranscrit en ADNc. Ce dernier a été amplifié par PCR en temps réel grâce à des amorces spécifiques de l'ARNm d'intérêt. Les résultats sont exprimés en tant que moyennes \pm un écart-type (n= 3).

Hypoxie chronique/ Normoxie			
ALDOA	1,63	2,03	1,52
AMH	0,63	0,49	0,58
BAG3	0,57	0,99	0,59
BMP6	1,02	1,68	0,95
BMPR2	0,75	1,69	0,96
CASP1	0,64	1,15	1,01
CCL2	0,40	0,39	0,31
CCL5	0,56	0,96	0,99
CDKN1A	0,59	0,58	0,52
CNTFR	0,22	ND	ND
CRHR1	0,40	0,67	ND
CSF1	ND	0,15	0,12
CSF1R	0,36	0,78	ND
CSF2	0,81	0,59	0,71
CSF3	0,46	0,49	ND
CSF3R	ND	1,67	ND
EDNRB	0,19	ND	0,29
EGFR	0,55	ND	0,72
EGR1	0,58	0,58	0,51
EPHB1	0,43	ND	ND
FAS	ND	4,47	3,51
FGF2	0,59	1,07	1,09
FGF5	0,69	0,95	0,51
FGF6	0,17	ND	ND
FLT4	0,66	1,86	0,79
FOS	0,03	ND	0,06
FOSL1	0,54	0,58	0,56
HBEGF	0,50	0,52	0,35
HIF1A	0,37	0,73	0,54
HPRT1	0,92	1,73	1,15
HRAS	0,75	0,52	0,57
IFNAR1	0,40	2,55	ND
IGF1R	0,27	1,08	1,07
IGFBP2	0,29	0,94	0,97
IL11	0,66	2,56	0,53
IL7R	ND	ND	0,17

IRAK1	0,87	0,80	0,43
IRF1	0,50	0,59	0,50
IRF2	0,19	ND	0,23
IRF7	ND	3,02	ND
JAK1	0,73	1,66	0,95
LAT	0,95	2,32	0,05
LTBR	0,75	0,69	0,51
MAP2K4	0,67	0,58	2,58
MAP2K7	1,60	2,90	2,25
MAPK14	0,46	3,49	0,71
MAPK8	ND	3,86	ND
MAPK9	0,58	0,96	0,88
MET	0,65	1,08	1,02
MMP2	1,23	1,65	1,21
MYC	0,97	1,66	1,20
PDGFA	0,30	3,57	0,23
PGF	0,79	0,59	0,59
PLAA	ND	3,00	ND
RUNX1	2,21	3,25	2,15
SELL	0,87	2,42	0,52
SOCS2	0,29	0,30	0,47
SRF	0,63	0,99	0,58
STAT2	2,95	1,02	0,85
TFRC	0,02	0,04	0,03
THBD	0,30	0,35	0,23
TLR4	0,77	0,95	1,91
TNFRSF11A	ND	ND	4,11
TNFRSF7	ND	0,79	0,18
TNFSF14	ND	0,28	0,09
TRADD	1,58	1,25	1,30
TRAF2	0,61	0,59	0,66
TRAF3	0,36	1,90	0,90
TRAF6	0,39	0,36	0,86
VEGF	4,44	12,48	9,26
YWHAZ	0,66	1,65	0,74

Tableau 1: Effet de l'hypoxie chronique sur l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation. Pour ce faire, les cellules EAhy926 ont été incubées 7h30 en hypoxie chronique ou en normoxie. Au terme des incubations, l'ARN a été extrait puis rétrotranscrit en ADNc. Le produit de cette rétrotranscription est ensuite hybridé sur la « Dualchip human inflammation ». L'intensité des spots a été quantifiée après des étapes de lavages et séchage. Les résultats sont normalisés par rapport à la normoxie.

Les valeurs inférieures à 1 montrent une sous-expression du gène tandis que les valeurs supérieures à 1 représentent une surexpression du gène par rapport à la condition contrôle normoxie.

Les valeurs quantitatives significatives sont représentées en jaune, les valeurs qualitatives significatives en vert, les house keeping genes en mauve, les valeurs non détectées sont notées ND.

Hypoxie intermittente/ Normoxie			
AMH	1,76	0,77	1,32
ATF2	0,56	3,57	0,74
BAG3	0,68	0,57	0,66
BDNF	1,33	1,83	1,70
BMP1	2,43	0,93	0,44
BMPR2	0,85	1,75	1,31
CDKN1A	0,68	0,61	0,69
CEBPB	0,61	0,39	0,49
CNTFR	0,64	ND	ND
CRHR1	0,61	0,60	5,37
CSF1	ND	0,60	ND
CSF1R	1,31	0,78	ND
CSF2	0,55	0,49	0,37
CSF3	0,58	0,30	ND
EDNRB	0,59	ND	1,12
EGFR	1,88	ND	1,13
EGR1	0,57	0,69	0,59
EPHB1	0,62	ND	ND
EPHB2	1,50	1,34	1,52
EPOR	0,61	0,58	0,65
F2R	1,42	1,62	1,71
FADD	0,66	0,52	0,63
FGF2	0,79	1,73	1,69
FGF5	0,99	1,68	1,03
FGF6	0,16	ND	ND
FLT4	0,50	ND	0,41
FOS	0,19	ND	0,00
FOSL1	0,82	0,49	0,67
HBEGF	0,70	0,61	0,77
HIF1A	0,64	1,09	0,95
ICAM3	0,74	0,51	0,60
IFNAR1	0,36	2,86	1,20
IGF1R	0,79	0,87	0,33
IGFBP2	0,57	3,35	1,62
IGFBP3	3,85	ND	ND
IL11	0,78	2,80	0,51
IL15	ND	3,37	2,33

IRF1	1,77	1,43	1,54
IRF2	0,23	ND	0,20
IRF3	1,04	0,58	0,97
ISGF3G	0,71	0,60	0,56
JUN	0,66	0,57	0,59
LAT	0,40	ND	0,26
LTBR	1,52	0,87	1,08
MAP2K4	0,37	0,99	3,52
MAP2K7	1,03	2,49	2,02
MAP3K7	0,67	0,99	1,12
MAPK14	0,69	0,37	0,62
MAPK8	ND	ND	2,83
NRG1	0,62	0,34	0,64
PDGFA	0,58	0,16	0,23
PDGFB	0,66	0,61	0,59
PGF	0,93	0,50	0,70
PLAA	2,16	3,48	3,05
PML	1,06	0,98	2,22
PPIE	0,88	0,34	0,78
RUNX1	3,44	3,77	4,26
SELL	0,32	0,25	0,98
STAT2	2,23	0,70	0,98
TAP1	0,60	0,51	0,67
TFRC	0,63	0,73	0,84
TGFB1	0,81	0,59	0,90
THBD	0,50	0,42	0,39
TLR4	0,33	1,19	1,67
TNFRSF10A	1,88	ND	ND
TNFRSF10B	0,81	0,60	0,80
TNFRSF11A	3,14	ND	ND
TNFRSF1A	0,77	0,53	0,66
TNFRSF7	1,85	0,19	0,31
TNFSF14	ND	0,18	0,34
TRAF2	0,59	0,45	0,68
TRAF3	1,05	3,40	0,55
TRAF6	1,29	1,09	0,46
VEGF	2,12	ND	ND

Tableau 2: Effet de l'hypoxie intermittente sur l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation. Pour ce faire, les cellules EAhy926 ont été incubées 7h30 en hypoxie intermittente ou en normoxie. Au terme des incubations, l'ARN a été extrait puis rétrotranscrit en ADNc. Le produit de cette rétrotranscription est ensuite hybridé sur la « Dualchip human inflammation ». L'intensité des spots a été quantifiée après des étapes de lavages et séchage. Les résultats sont normalisés par rapport à la normoxie. Les valeurs inférieures à 1 montrent une sous-expression du gène tandis que les valeurs supérieures à 1 représentent une surexpression du gène par rapport à la condition contrôle normoxie. Les valeurs quantitatives significatives sont représentées en jaune, les valeurs qualitatives significatives en vert, les house keeping genes en mauve, les valeurs non détectées sont notées ND.

Réoxygénation/ Normoxie			
ATF2	0,55	ND	0,63
BAG3	0,57	0,70	0,58
BDNF	1,67	1,86	1,53
BMP1	0,73	0,84	0,52
CASP1	0,64	0,71	1,02
CCL2	1,28	1,63	1,65
CCL5	0,53	0,80	0,90
CD3E	2,94	ND	ND
CD40	0,82	0,73	0,62
CEBPB	0,80	0,57	0,64
CNTF	ND	ND	8,68
CSF1	ND	0,25	0,78
CSF1R	2,66	0,78	ND
CSF2	0,56	0,73	0,94
CSF3	0,32	0,53	ND
CSF3R	2,69	ND	ND
EDNRB	0,63	1,93	1,75
EGFR	2,26	ND	1,15
EGR1	0,76	0,59	0,64
EPHB2	1,44	1,42	1,52
F2R	1,84	1,85	2,09
FCER2	3,05	ND	ND
FGF2	1,30	1,50	1,97
FLT4	0,62	ND	0,71
FOS	0,04	ND	0,43
FOSL1	0,60	0,41	0,57
HBEGF	0,77	0,60	0,52
HIF1A	0,65	0,92	0,91
HRAS	1,11	0,55	0,73
ICAM3	0,63	0,54	0,62
IFNAR1	1,55	2,69	1,96
IL11	1,12	3,59	0,87
IL15	3,01	3,59	3,92
IL7R	ND	ND	0,56
IRAK1	0,95	0,78	0,53

IRF2	0,08	ND	0,43
IRF3	0,77	0,55	0,58
ISGF3G	0,64	0,62	0,49
JUN	0,57	0,70	0,59
LAT	0,61	ND	0,24
LTBR	1,05	0,88	0,64
MAP2K4	0,35	0,91	2,69
MAP2K7	1,78	2,74	2,27
MAPK14	0,59	2,63	0,56
MAPK8	2,31	4,01	ND
MET	0,67	0,94	0,99
NRG1	0,63	0,73	0,60
PDGFA	0,20	0,52	0,16
PGF	0,75	0,53	0,66
PLAA	ND	2,63	2,00
PML	1,10	0,87	1,97
PPIE	0,84	0,50	0,74
PRDX5	0,74	0,73	0,62
RUNX1	2,48	ND	2,59
SELL	0,35	0,64	0,58
STAT2	0,86	0,28	0,60
TAP1	0,64	0,66	0,80
TFRC	0,63	0,65	0,87
THBD	0,36	0,40	0,38
TLR4	1,23	1,46	1,78
TNFRSF10A	ND	2,40	ND
TNFRSF11A	3,33	7,45	ND
TNFRSF1A	0,65	0,48	0,66
TNFRSF7	ND	0,79	0,23
TNFSF14	ND	0,53	0,41
TRAF2	0,75	0,54	0,81
TRAF3	0,57	4,22	1,54
TRAF6	1,54	0,91	1,21
VEGF	1,92	7,01	4,23

Tableau 3: Effet de la réoxygénation sur l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation. Pour ce faire, les cellules EAhy926 ont été incubées 7h30 en hypoxie intermittente suivie de 1 heure de réoxygénation ou en normoxie. Au terme des incubations, l'ARN a été extrait puis rétrotranscrit en ADNc. Le produit de cette rétrotranscription est ensuite hybridé sur la « Dualchip human inflammation ». L'intensité des spots a été quantifiée après des étapes de lavages et séchage. Les résultats sont normalisés par rapport à la normoxie. Les valeurs inférieures à 1 montrent une sous-expression du gène tandis que les valeurs supérieures à 1 représentent une surexpression du gène par rapport à la condition contrôle normoxie. Les valeurs quantitatives significatives sont représentées en jaune, les valeurs qualitatives significatives en vert, les house keeping genes en mauve, les valeurs non détectées sont notées ND.

	Hypoxie chronique	Hypoxie intermittente	Réoxygénation
AMH	0,57		
ATF2			0,59
BAG3	0,58	0,61	
BDNF		1,76	1,7
CCL2	0,37		
CDKN1A	0,57		
CEBPB		0,5	
EGR1	0,54		
EPHB2		1,51	
EPOR		0,61	
F2R		1,71	1,9
FADD		0,6	
FAS	++		
FGF2		1,71	
FLT4		0,45	
FOSL1	0,56	0,58	0,55
HBEGF	0,46		
HIF1A	0,45		
HRAS	0,54		
ICAM3		0,55	0,6
IFNAR1			1,55
IL15		++	++
IRF1	0,53	1,65	
IRF3			0,56
ISGF3G		0,58	0,56
JUN		0,6	0,58
MAP2K7	++	+	++
MAPK14			0,57
MAPK8			++
NRG1		0,63	0,61
PDGFB		0,63	
PGF	0,59		0,59
PLAA		++	++
RUNX1	++	++	++
SRF	0,6		
TAP1		0,55	
THBD	0,29	0,44	0,38
TNFRSF11A			+++
TNFRSF1A		0,59	0,6
TRAF2		0,52	
VEGF	+++		++

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des gènes qui varient de manière quantitative significative ou qualitative significative en hypoxie intermittente, en hypoxie chronique ou en réoxygénation. Les valeurs représentent les valeurs d'induction ou de répression. Lorsque la valeur est inférieure à 1, le gène est sous-exprimé par rapport à la normoxie. Lorsque la valeur est supérieure à 1, le gène sur-exprimé par rapport à la normoxie. Les signes + montrent une augmentation qualitative de l'expression de gènes. Code : + si supérieur à 1
++ si supérieur à 2
+++ si supérieur à 5

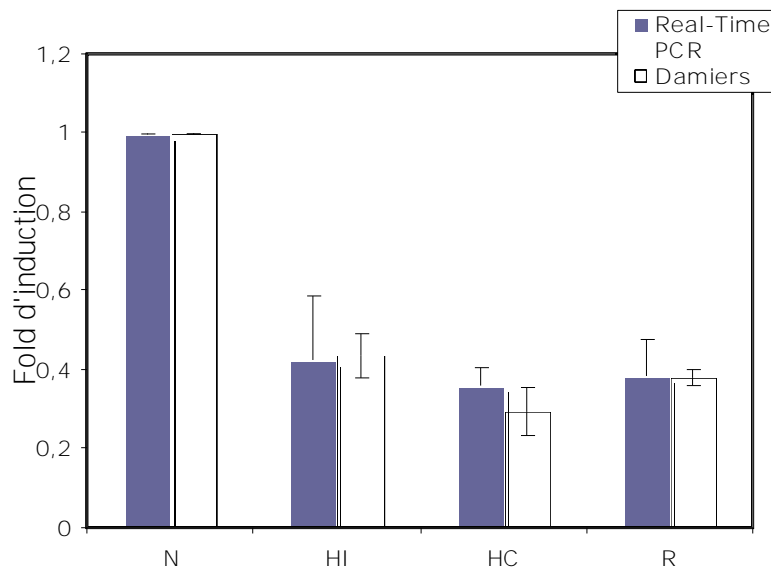
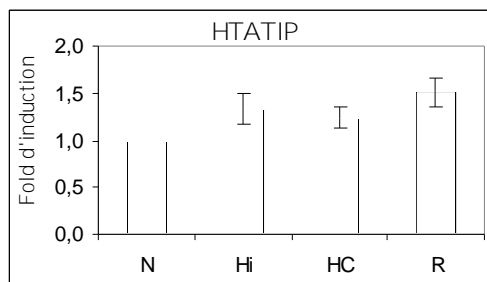
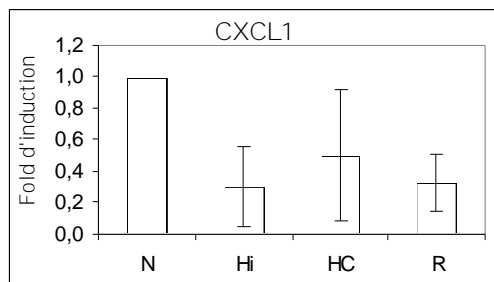
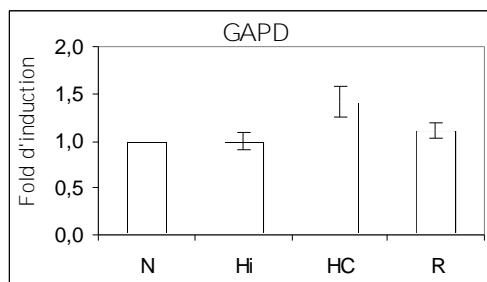
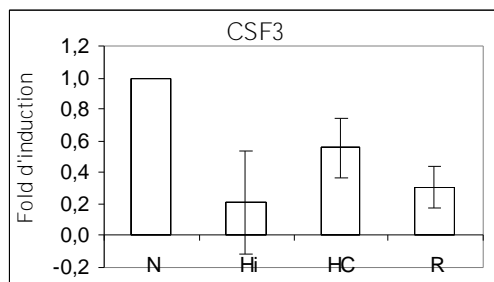
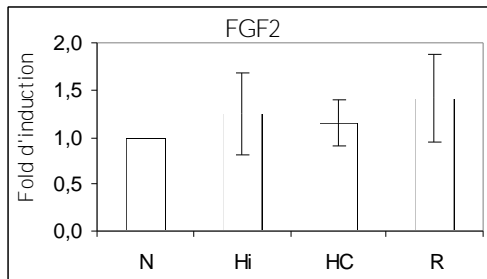
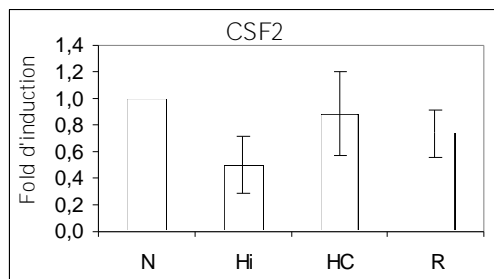
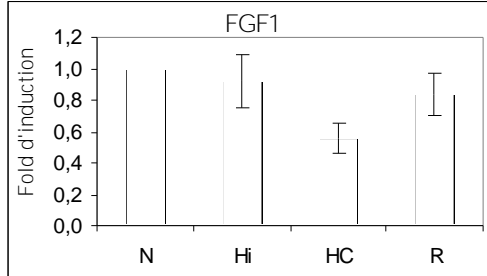
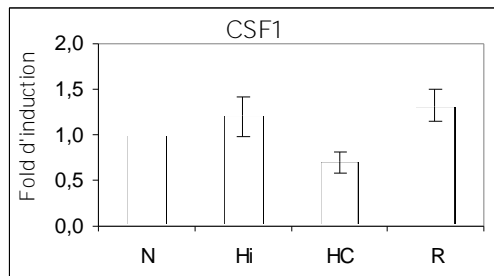
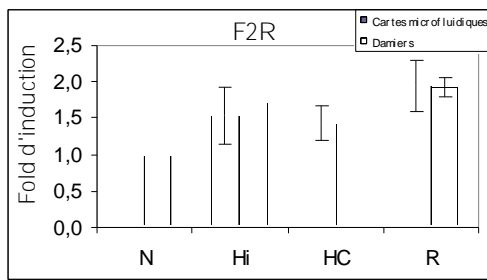
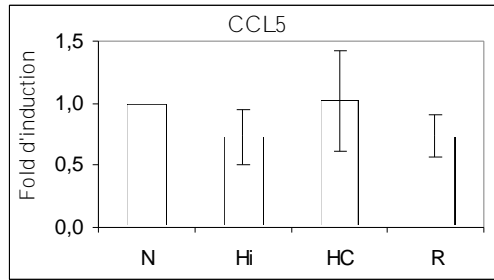
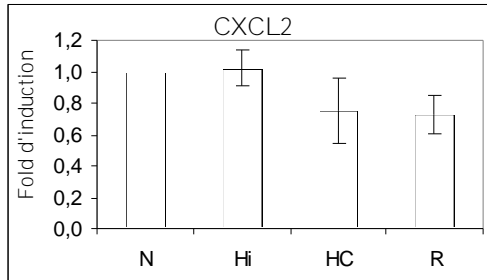
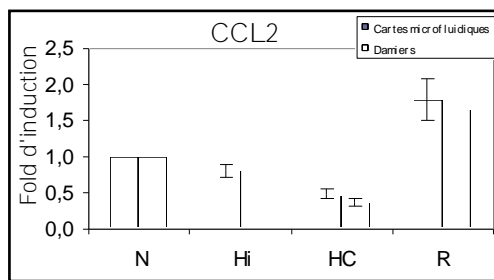


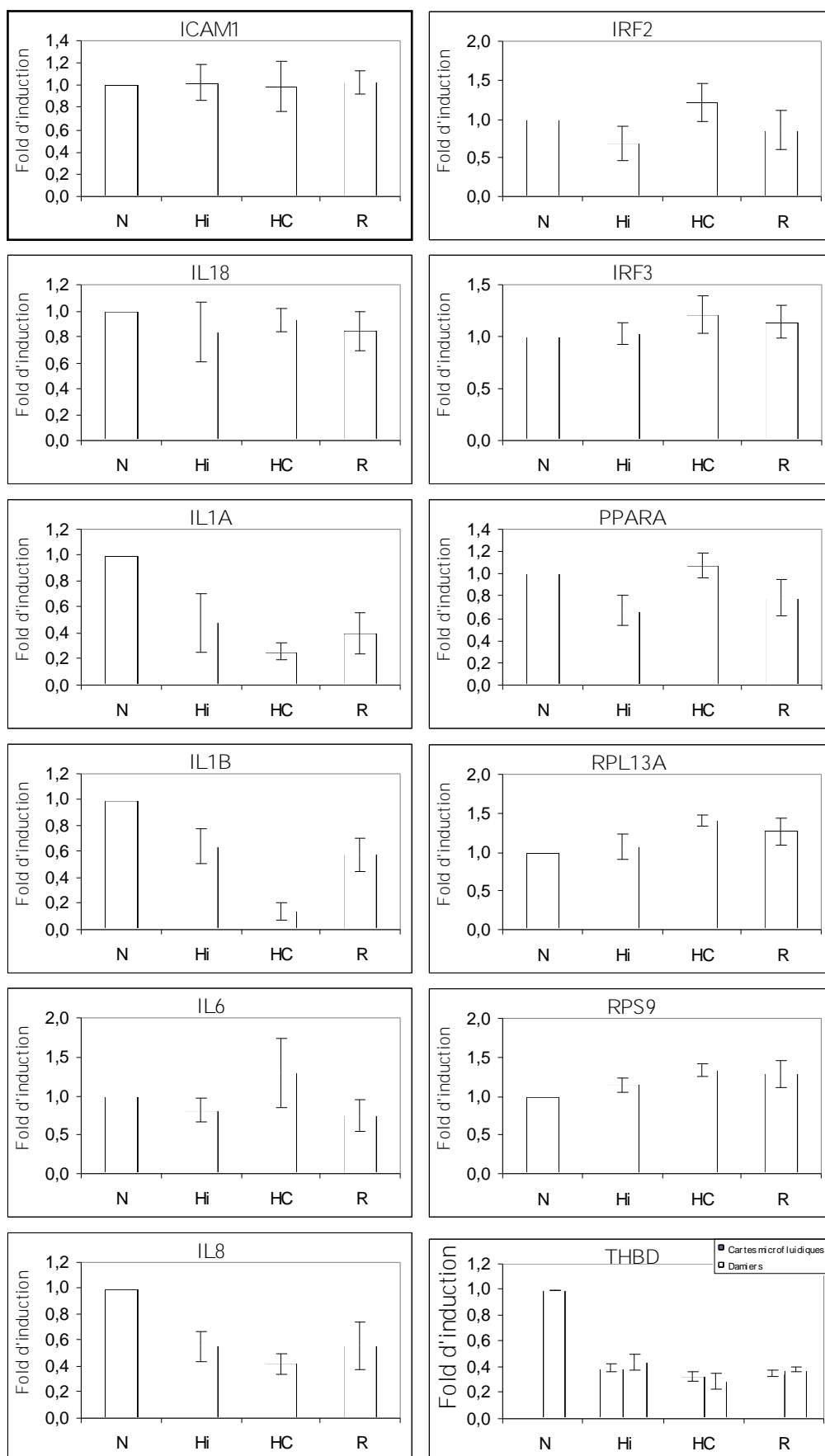
Figure 12 : Effet de l'hypoxie intermittente et de l'hypoxie chronique sur l'expression du gène THBD. Les cellules ont été incubées en 7h30 en hypoxie intermittente (HI), en hypoxie chronique (HC) ou en normoxie (N). Une extraction d'ARNtotal a ensuite été réalisée. Pour ce qui est de l'hypoxie intermittente, une extraction fut effectuée après la dernière hypoxie ainsi qu'après la dernière réoxygénation (1h). L'ARNm a été rétrotranscrit en ADNc. Ce dernier a été amplifié par PCR en temps réel grâce à des amorces spécifiques de l'ARNm d'intérêt. Les résultats sont exprimés en fold d'induction en tant que moyennes \pm un écart-type (n= 3). Ce graphe représente à la fois les résultats obtenus suite à la PCR en temps réel et ceux obtenus suite à l'hybridation sur le microdamier.

Gènes représentés sur le damier					
	DualChip HI	Taqman LDA		DualChip HI	Taqman LDA
ACTB *	non	oui	PTGS2	non	non
CCL2	oui	oui	RPL13A *	non	oui
CCL5	oui	oui	RPS9 *	non	oui
CCL8	non	non	SELE	non	non
CCL11	non	non	THBD	oui	oui
CSF1	oui	oui	TIMP1	non	oui
CSF2	oui	oui	TNF	non	non
CSF3	oui	oui	VCAM1	non	non
CXCL1	non	oui	Gènes supplémentaires à étudier		
CXCL2	non	oui	Taqman LDA		
CXCL12	non	non	CCL3	non	
CXCR4	non	non	CCL4	non	
EDN2	non	non	HTATIP	oui	
EDN3	non	non	IFNG	non	
F2R	oui	oui	LTB	non	
FGF1	non	oui	TIMP2	oui	
FGF2	oui	oui			
GAPDH **	non	oui	* Contrôle endogène potentiel (House-Keeping Gene)		
ICAM1	non	oui	** Contrôle (Mandatory Control)		
IL1A	non	oui			
IL1B	non	oui			
IL1RN	non	non			
IL6	non	oui			
IL8	non	oui			
IL18	non	oui			
IRF2	oui	oui			
IRF3	oui	oui			
LIF	non	non			
LTA	non	non			
OSM	non	non			
PLA2G4C	non	non			
PPARA	non	oui			
PPARG	non	non			
PPBP	non	non			

Tableau 5 : Tableau représentant la liste des gènes étudiés (détectés ou non) grâce aux cartes microfluidiques. La première partie reprend les gènes qui pouvaient également être détectés à l'aide des microdamiers alors que la deuxième reprend les gènes pour lesquels il n'y avait pas de sonde sur les damiers.

10 gènes sur 42 détectables l'ont été à l'aide des microdamiers tandis que 27 sur 48 le furent à l'aide des cartes microfluidiques.





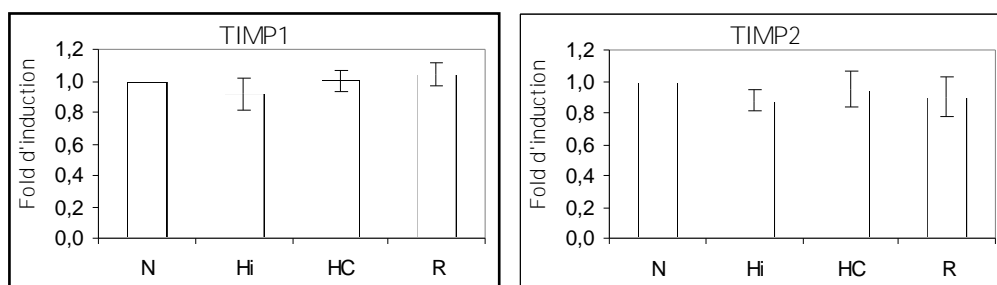


Figure 13 : Effet de l'hypoxie intermittente et de l'hypoxie chronique sur l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation. Pour cela, les cellules EAhy926 ont été incubées 7h30 en hypoxie intermittente, en hypoxie chronique ou en normoxie. Au terme des incubations, l'ARN total a été extrait. Pour l'hypoxie intermittente, l'extraction a été réalisée directement après l'hypoxie et après 1 heure de réoxygénation. L'ARNm a ensuite été rétrotranscrit en ADNc. Ce dernier a été amplifié par PCR en temps réel grâce à des amorces spécifiques de l'ARNm d'intérêt à l'aide de cartes microfluidiques. Les résultats sont exprimés en fold d'induction en tant que moyennes \pm un écart-types (n= 3). Quand ils étaient disponibles, les résultats obtenus à l'aide des microdamiers sont également représentés.

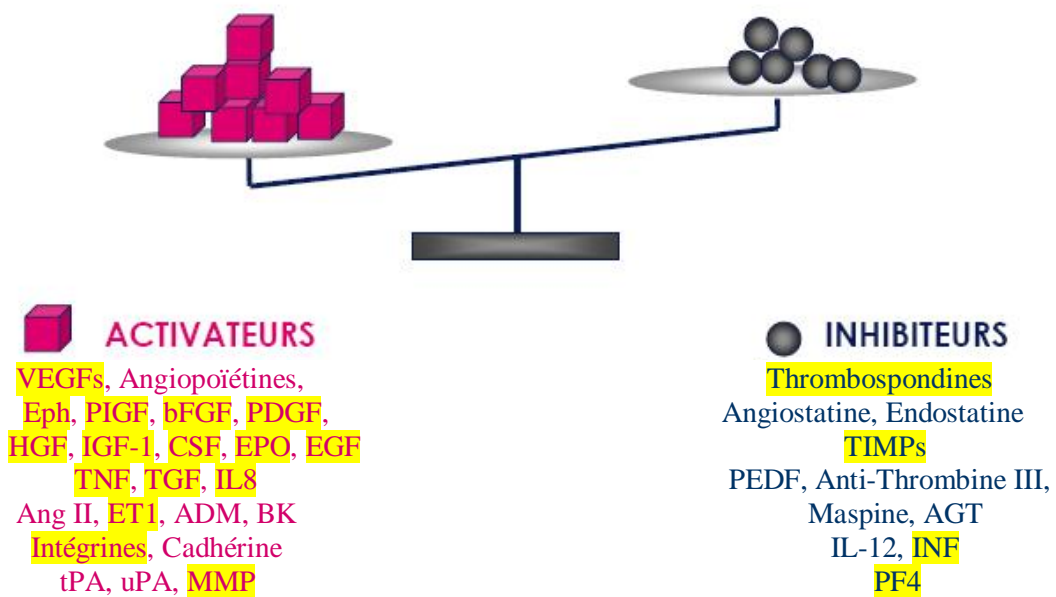


Figure 14 : L'angiogenèse, une balance dynamique entre activateurs et inhibiteurs. Les gènes surlignés en jaune représentent les gènes détectables par les microdamiers ou les cartes microfluidiques.

Anticorps dirigé contre...	Anticorps primaire	Espèce	Anticorps secondaire
Nrf2	Anticorps anti-Nrf2 (Sc-722) (dilution 200x) Santa Cruz	Lapin	Anti-Ig de lapin couplé à l'Alexa 488nm (Molecular Probes, USA) (dilution 1000x)
NF- κ B (p65)	Anticorps anti-p65 (Sc-372) (dilution 100x) Santa Cruz	Lapin	Anti-Ig de lapin couplé à l'Alexa 488nm (Molecular Probes, USA) (dilution 1000x)
HIF-1 α	Purified mouse anti HIF-1 α (dilution 100x) BD Transduction Laboratories 610958	Souris	Anti-Ig de souris couplé à l'Alexa 488nm (Molecular Probes, USA) (dilution 1000x)

Tableau 1: Les différents anticorps utilisés pour le marquage en immunofluorescence.

Gel Buffer (200 ml)	Ø 36,3 g de TRIS (ICN Biomedicals,USA) Ø 0,8 g de SDS (ICN Biomedicals, USA) Ø pH 8,9
Gel Mix 10% (35 ml)	Ø 8,4 ml de gel buffer Ø 11,6 ml d'acryl/bis (Bio-Rad, USA) Ø 15 ml d'H ₂ O
Gel séparateur	Ø 35 ml de gel Mix 10% Ø 175 µl d'APS 25% (Pharmacia Biotech AB, Suède) Ø 10,5 µl de TEMED (Pharmacia Biotech AB, Suède)
Spacer Gel Buffer (100 ml)	Ø 5,1 g de TRIS (ICN Biomedicals, USA) Ø 0,4 g de SDS (ICN Biomedicals, USA) Ø pH 6,8
Spacer Gel Mix (240 ml)	Ø 60 ml de Spacer Gel Buffer Ø 40 ml d'acryl/bis (Bio-Rad, USA) Ø 140 ml d'H ₂ O
Gel concentrateur	Ø 10 ml de Spacer Gel Mix Ø 50 µl d'APS 25% (Pharmacia Biotech AB, Suède) Ø 3 µl de TEMED (Pharmacia Biotech AB, Suède)
Running Buffer 10x (1 litre)	Ø 63,2 g de TRIS (ICN Biomedicals, USA) Ø 40 g de Glycine (ICN Biomedicals, USA) Ø 10 g de SDS (ICN Biomedicals, USA)
Tampon de transfert (5 litres)	Ø 24 g de TRIS (ICN Biomedicals, USA) Ø 115 g de Glycine (ICN Biomedicals, USA) Ø 1 litre de méthanol (Merck, Allemagne)
TBS 10x (1 litre)	Ø 24,22 g de TRIS (ICN Biomedicals, USA) Ø 80,06 g de NaCl Ø pH 7,6
TBS-Tween 0,1 %	Ø 100 ml de TBS 10x Ø 900 ml d'H ₂ O Ø 1 ml de Tween 20 (Sigma, USA)
TBS-T + 2% de lait Amersham	Ø TBS- Tween 0,1 % Ø 2% de Blokking Agent (Amersham CDK105,USA)
Bleu de charge 5x	Ø 10 ml de Spacer Gel Buffer Ø 10 ml de SDS 20% (ICN Biomedicals, USA) Ø 5 ml de -mercaptoéthanol Ø 10 ml de Glycérol (Merck, Allemagne) Ø 17,5 mg de bleu de bromophénol (Janssens Chimica, Belgique)

Tableau 2 : Composition des différentes solutions utilisées pour le Western Blot

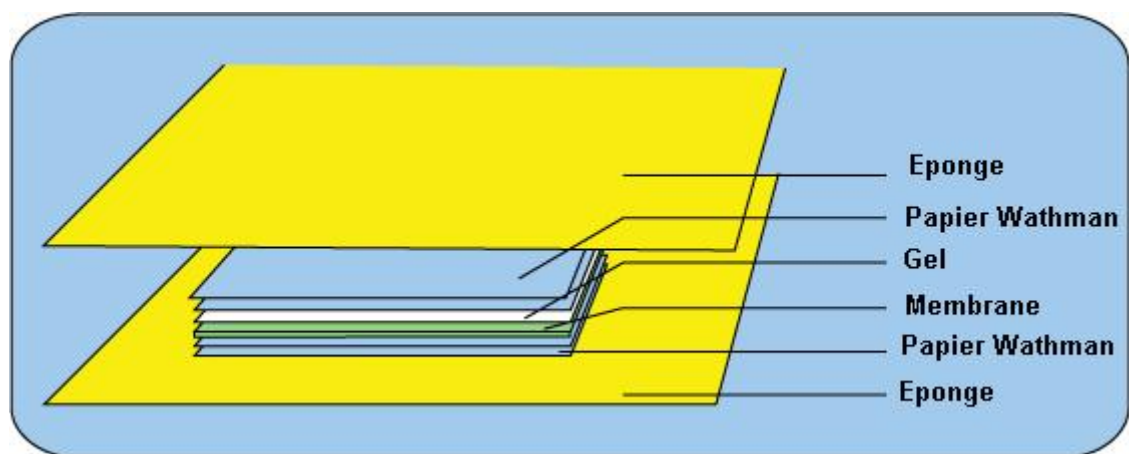


Figure 1 : Système de sandwich réalisé lors du Western Blot

Anticorps dirigé contre...	Anticorps primaire	Espèce	Anticorps secondaire
HIF-1 α	Purified mouse anti HIF-1 α (dilution 2000x) BD Transduction Laboratories 610958	Souris	Anticorps anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (dilution 150000x) (Amersham,USA)
Nrf2	Anticorps anti-Nrf2 (Sc-30915)(dilution 1000x) Santa Cruz	Chèvre	Anticorps anti-IgG de chèvre couplé à la peroxydase (dilution 150000x)
NF κ B	Anticorps anti-p65 (Sc-372) (dilution 5000x)	Lapin	Anticorps anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase (dilution 100000x)(Amersham ,USA)
α -Tubuline	Purified mouse anti- α -tubulin (dilution 30000x) (T5168, Sigma, USA)	Souris	Anticorps anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (dilution 150000x) (Amersham,USA)
Lamine	Anticorps anti-lamine	Lapin	Anticorps anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase (dilution 100000x)(Amersham ,USA)

Tableau 3 : Anticorps utilisés pour la révélation en Western Blot

Mix dNTP 10x	Ø 2 µl de dATP 100 mM Ø 2 µl de dTTP 100 mM Ø 2 µl de dGTP 100 mM Ø 2 µl de dCTP 16 mM Ø 32 µl de dCTP-biotine 1mM
Mix réactionnel (9 µl)	Ø 4 µl de Buffer RT 5x Ø 2 µl de DTT 0,1 M Ø 1 µl de RNAsin (40U/ml) Ø 2 µl de Mix dNTP 10x

Tableau 4 : Composition des solutions utilisées lors de la reverse transcription précédant les hybridations sur damiers

Mix réactionnel (9 µl)	Ø 4 µl de Buffer RT 5x Ø 2 µl de DTT Ø 1 µl de RNAsin Ø 2 µl de dNTP mix
------------------------	---

Tableau 6 : Composition du mélange réactionnel utilisé lors de la reverse transcription précédant les réactions de real-time PCR

⇒ $\delta Ct = Ct \text{ du gène d'intérêt} - Ct \text{ du HKG}$
⇒ $\delta\delta Ct = \delta Ct \text{ du gène d'intérêt dans une certaine condition} - \delta Ct \text{ du gène d'intérêt dans la condition contrôle (normoxie)}$
⇒ $\text{Fold d'induction} = 2^{-\delta\delta Ct}$

Tableau 7 : Formules utilisées pour calculer le fold d'induction

HB 10x (100ml)	Ø 0,21 g de NaF (Merck, Allemagne) Ø 0242 g de Na ₂ MoO ₄ (Sigma, USA) Ø 4,75 g d'Hepes (Acro Organics) Ø 37 mg de EDTA (Merck, Allemagne) Ø pH 7,9
Tampon de lyse (100 ml)	Ø 10 ml de HB 10x Ø 89,8 ml d'H ₂ O Ø 200 µl de NP-40
Tampon RE (100 ml)	Ø 10 ml de HB 10x Ø 70 ml d'H ₂ O Ø 20 ml de glycérol 87% (Merck, Allemagne)
Tampon SA (100 ml)	Ø 10 ml de HB 10x Ø 20 ml de glycérol 87% (Merck, Allemagne) Ø 20 ml de NaCl 4 M Ø 50 ml d'H ₂ O
RE complet	Ø 1 ml de RE Ø 40 µl de PIC Ø 40 µl de PIB
SA complet	Ø 1 ml de SA Ø 40 µl de PIC Ø 40 µl de PIB
PBS + 1mM Na ₂ MoO ₄ + 5mM NaF (1 litre)	Ø 20 ml de tampon PO ₄ ⁻ 0,5M pH 7,4 Ø 9 g NaCl Ø 0,242 g de Na ₂ MoO ₄ (Sigma, USA) Ø 21 mg de NaF (Merck, Allemagne)

Tableau 8 : Composition des différentes solutions utilisées lors de l'extraction nucléaire

Gène cible de...	Gène étudié	Référence primer	Séquence
NRF2	NQO1	NQO1 HUMAN-96F	AATTCAGAGTGGCATTCTGCATTT
		NQO1 HUMAN-175R	CTGGAGTGTGCCCAATGCTATA
	HO-1	HO-1 HUMAN-16F	GCAGTCAGGCAGAGGGTGATA
		HO-1 HUMAN-87R	CAACTCCTCAAAGAGCTGGATGTT
	GCS	GCS HUMAN-108F	GAAGAGAGCATCTGGAGAACTAATGA
		GCS HUMAN-201R	AGTTATGACACTGTCTTGCTTGTAGTCA
	GSTP1	GSTP1 HUMAN-94F	TCAAAGCCTCCTGCCTATACG
		GSTP1 HUMAN-173R	CAGGATGGTATTGGACTGGTACAG
HIF1	Glut1	Glut1-51F	GTGGGCATGTGCTTCCAGTA
		Glut1-127R	AGAACCAGGAGCACAGTGAAGAT
	Aldolase	AldoA716F	TCGGCAGGAGGAGTATGTCA
		AldoA837R	AGGCGTGGTTAGAGACGAAGAG
NF-κB	IL8	IL8-114F	CTG GCCGTGGCTCTCTTG
		IL8-238R	GGGTGGAAAGGTTTGGAGTATG
	Tubuline	Tubu178F	CCC GAG GGC ACT ACA CCAT
		Tubu323R	CAGGGAGGTGAACCCAGAAC

Tableau 5 : Amorces utilisées pour les différentes réactions PCR en temps réel.

Solutions	Trans-AM HIF-1 α	Trans-AM Nrf2	Trans-AM NF- κ B
Tampon de lyse	<ul style="list-style-type: none"> Ø 1ml tampon RE Ø 1 ml tampon SA Ø 2 μl de DTT 1M Ø 80 μl PIC Ø 80 μl PIB 	<ul style="list-style-type: none"> Ø 800 μl tampon RE Ø 200 μl tampon SA Ø 40 μl PIC Ø 40 μl PIB 	Tampon de lyse stock : <ul style="list-style-type: none"> Ø Hepes 20 mM Ø NaCl 350 mM Ø MgCl₂ 1mM Ø EDTA 0,5 mM Ø EGTA 0,1 mM Ø Glycérol 20% Ø NP-40 1% Ø pH 7,5 Tampon de lyse complet : <ul style="list-style-type: none"> Ø 2 ml de tampon de lyse stock Ø 10 μl DTT 1M Ø 80 μl PIC
Tampon de binding concentré	<ul style="list-style-type: none"> Ø Tris HCl 50 mM Ø EDTA 5mM Ø NaCl 250 mM Ø Glycérol 25% Ø H₂O Ø PH 7,8 	<ul style="list-style-type: none"> Ø Hepes 2mM Ø EDTA 0,2 mM Ø NaCl 8 mM Ø Glycérol 12% Ø H₂O Ø pH 7,5 	<ul style="list-style-type: none"> Ø Hepes 10 mM Ø KCl 300 mM Ø Glycérol 20% Ø H₂O Ø PH 7,5
Tampon de binding complet	<ul style="list-style-type: none"> Ø 1 ml de tampon de binding concentré Ø 5μl DTT 0,5M Ø 3 ml H₂O 	<ul style="list-style-type: none"> Ø 1 ml de tampon de binding concentré Ø 2 μl de DTT 1M 	<ul style="list-style-type: none"> Ø 1 ml de tampon de binding concentré Ø 500 μl BSA 5% Ø 500 μl DSS 0,05 mg/ml Ø 500μl d'H₂O Ø 5μl de DTT 1M
Lysat	Dilué dans du tampon de lyse à une concentration de 5 μ g/ 10 μ l	Dilué dans du tampon de lyse à une concentration de 10 μ g/ 20 μ l	Dilué dans du tampon de lyse à une concentration de 10 μ g/ 20 μ l
Anticorps primaire	Anti HIF1- α (BD610958) dilué 1000x dans PBS50+BSA1%	Anti-Nrf2 (sc-13032) dilué 500x dans PBS50+BSA1%	Anti-P65 (sc-372) dilué 1000x dans PBS50+BSA1%
Anticorps secondaire	Anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (dilution 1000x)	Anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase (dilution 1000x)	Anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase (dilution 1000x)
Solution de lavage	PBS 50 + 0,1% Tween PBS50 (pour 1 litre) : pH 7,4 <ul style="list-style-type: none"> Ø 3 g de NaCl Ø 20 ml de tampon phosphate 0,5 M Ø Eau distillée 		

Tableau 9: Composition des solutions utilisées lors des dosages Trans-AM



Figure 2 : Représentation d'une carte microfluidique.

	Nom du plasmide	Provenance du plasmide	Nombre de boîtes présentes dans le promoteur
HIF-1	pGL3 (PGK HRE) ₆ -tK-Luc	Maxwell et al. 1999	6(HRE)
Nrf2	Are promoter-luciferase reporter construct (NQO1 wild-type)	Leonard et al. 2006	
NF-κB	pNF-κB-Luc	Pathdetect (Stratagene, USA)	5

Tableau 11 : Différents plasmides rapporteurs utilisés

	Etape1	Etape 2	Etape 3	Etape 4
Température (C°)	25	37	85	4
Temps	10 minutes	120 minutes	5 sec	Infini

Tableau 10: Différentes étapes de la reverse transcription



	 ACTIVATEURS	 INHIBITEURS
Hypoxie Intermittente	EPHB \nearrow , bFGF \nearrow PDGF \searrow , CSF2 \searrow , CSF3 \searrow , IL8 \searrow	THBD \searrow
Hypoxie chronique	VEGF \nearrow , PDGF \searrow , CSF3 \searrow , IL8 \searrow ,	THBD \searrow
Réoxygénation	VEGF \nearrow , CSF3 \searrow , IL8 \searrow	THBD \searrow

Tableau 6: Tableau reprenant les variations de gènes qui sont à la fois surlignés sur la figure 14 et détecté grâce aux cartes microfluidiques ou aux microdamiers.



	 ACTIVATEURS	 INHIBITEURS
Hypoxie Intermittente	IL15 \nearrow , BDNF \nearrow , F2R \nearrow	PPAR α \searrow
Hypoxie Chronique	F2R \nearrow , IL6 \nearrow , CCL2 \searrow , IL1 α \searrow , IL1 \searrow , PGF \searrow , HBEGF \searrow	
Réoxygénation	TNFRSF11A \nearrow , BDNF \nearrow , EPOR \searrow , FLT4 \searrow ICAM3 \searrow , NRG1 \searrow	PPAR α \searrow

Tableau 7 : Variations de gènes détectés grâce aux cartes microfluidiques et aux microdamiers mais qui ne sont pas représentés sur la figure 14.